

Pathogenetische und Molekularepidemiologische Studien zu *Francisella* in Deutschland

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kristin Köppen

Berlin, 2020

Diese Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Interaktionen bakterieller Krankheitserreger“ unter der Leitung von PD Dr. Klaus Heuner in der Abteilung „Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene“, Fachgebiet „Hochpathogene mikrobielle Erreger“ am Robert Koch-Institut zwischen April 2016 und März 2019 angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Klaus Heuner
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 15.06.2020

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Klaus Heuner, der mir diese Promotionsarbeit innerhalb seiner Arbeitsgruppe und die Teilnahme an diversen Fachkonferenzen ermöglicht hat.

Ebenso möchte ich mich für die außerordentlich gute Betreuung und die zahlreichen anregenden Diskussionen bedanken, die sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Begutachtung dieser Dissertation möchte ich mich neben PD Dr. Klaus Heuner bei Prof. Dr. Rupert Mutzel bedanken, der zugleich freundlicherweise die universitätsinterne Betreuung der Arbeit übernahm.

Ich danke außerdem allen Kooperationspartnern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Prof. Dr. Stefan Hippenstiel und Dr. Diana Fatykhova (Charité Berlin), PD Dr. Wolfgang Eisenreich und Dr. Fan Chen (TU München) sowie Dr. Laue und Frau Gudrun Holland (ZBS4, Robert Koch-Institut).

Ein großes Dankeschön gilt Kerstin Rydzewski, die mir stets hilfreich im Labor zur Seite stand. Ebenso möchte ich mich bei meinen Mit-Doktorandinnen, Hana Tlapák und Mareike Kunze, und den ehemaligen und rezenten Mitarbeitern der AG Heuner, Rosa Eienkel, Thea Böttcher und Isabel Prensa, für die gute Arbeitsatmosphäre und vielen Ratschläge jeglicher Hinsicht bedanken. Den Kollegen von ZBS2 danke ich für ihre Kollegialität und netten Gesprächsrunden.

Für die anhaltende Unterstützung und motivierenden Worte möchte ich mich besonders bei meinem Lebenspartner, Christian Jung, sowie bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	viii
Summery	x
I. Einleitung	1
1. <i>Francisella tularensis</i>	1
1.1. Taxonomie und Epidemiologie	1
1.2. Wirte und Übertragung	2
2. Tularämie	3
2.1. Tularämie beim Menschen	3
2.2. Tularämie bei Tieren	4
2.3. Diagnose, Behandlung und Prävention	5
2.4. Verbreitung der Tularämie	6
3. Wirt-Pathogen-Interaktion	7
4. Virulenzfaktoren von <i>Francisella</i>	9
4.1. Kapsel	10
4.2. LPS	11
4.3. Typ-IV-Pili	12
4.4. <i>Francisella</i> Pathogenitätsinsel	13
4.4.1. Typ-VI-Sekretionssystem	15
4.5. Weitere Virulenzfaktoren	18
5. Isolat <i>Francisella</i> sp. W12-1067	19
6. Zielsetzung	21
II. Material und Methoden	22
1. Material	22
1.1. Bakterienstämme	22
1.2. Genome	24
1.3. Vektoren	24
1.4. Plasmide	25
1.5. Oligonukleotide	26
1.6. Enzyme	28
1.7. Antikörper	28
1.8. Humanes Lungengewebe	28
1.9. Infektionsmodelle	29
1.10. Verwendete Kits	29
1.11. Chemikalien	30
1.12. Größenstandards	30
1.13. Medien, Puffer und Zusätze	31
1.13.1. Medien	31
1.13.2. Puffer	33
1.13.3. Antibiotika und weitere Zusätze	34
1.14. Geräte	35

2. Methoden.....	36
2.1. Kultivierungstechniken	36
2.1.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	36
2.1.2. Kultivierung von <i>Francisella</i>	36
2.1.3. Konservierung von Bakterien.....	36
2.1.4. Kultivierung von <i>A. lenticulata</i>	36
2.1.5. Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	36
2.1.6. Kultivierung von Zelllinien.....	37
2.2. Zellzahlbestimmung	37
2.2.1. Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer	37
2.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Spiral-Ausplattierer	37
2.2.3. Photometrische Bestimmung der Zellzahl	38
2.3. DNA-basierte Methoden	38
2.3.1. Synthetisch hergestellte Konstrukte	38
2.3.2. Isolation chromosomaler DNA	38
2.3.3. Isolation von Plasmid-DNA	39
2.3.4. Restriktionsverdau von DNA	39
2.3.5. Fällung von DNA	39
2.3.6. Ligation mit der T4 DNA-Ligase	40
2.3.7. Ligation mit dem pGEM®-T Easy Vektor.....	40
2.3.8. Polymerase-Kettenreaktion	41
2.3.8.1. Inverse PCR.....	42
2.3.8.2. Kolonie-PCR (PCR mit ganzen Bakterien).....	42
2.3.9. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	42
2.3.10. Gelelution von DNA-Fragmenten	43
2.3.11. DNA-Sequenzierung	43
2.3.12. Gesamtgenom-Sequenzierung.....	44
2.4. Herstellung elektrokompeter Bakterien.....	44
2.4.1. <i>E. coli</i>	44
2.4.2. <i>Francisella</i>	44
2.5. Transformation von Bakterien	45
2.5.1. Transformation durch Elektroporation	45
2.5.2. Transformation mittels Hitzeschock	45
2.5.3. Natürliche Transformation von F-W12	45
2.6. Herstellung von Deletionsmutanten	46
2.7. Komplementationen	46
2.8. Herstellung einer Tn5-Mutantenbank	47
2.9. „Scatterscreen“	47
2.10. Isolierung von primären Alveolarmakrophagen aus der humanen Lunge	47
2.11. Infektionsversuche	48
2.11.1. Zellkultur.....	48
2.11.2. <i>Ex vivo</i> Lungeninfektionsmodell.....	49
2.11.3. Lungendurchfluss	49
2.12. Wachstumsversuche	50
2.13. Stabilitätstestung	50

2.14.	<i>In vitro</i> ¹³ C- und ² H-Markierungsversuche mit F-W12	50
2.14.1.	Massenspektrometrie – GC/MS	51
2.15.	SDS-Stress-Test	51
2.16.	Proteinchemische Methoden	51
2.16.1.	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.16.2.	Western Blot (Semi-Dry-Verfahren).....	52
2.16.3.	Detektion von Proteinen mit Antikörpern	53
2.17.	Mikroskopie	53
2.17.1.1.	Elektronenmikroskopie.....	53
2.17.1.2.	Konfokal-Mikroskopie	54
2.18.	Software, Statistik und Bioinformatische Auswertung	54
III.	Ergebnisse	55
1.	Charakterisierung des neuen <i>Francisella</i> Isolates F-W12	55
1.1.	Suche nach einer potentiellen Wirtszelle	55
1.2.	Alternatives Typ-VI-Sekretionssystem	57
1.2.1.	Generierung von Deletionsmutanten.....	61
1.2.2.	Komplementierung der Deletionsmutanten.....	62
1.2.2.1.	Etablierung des Integrationsvektors FIV-Val in F-W12	62
1.2.2.2.	Komplementierung mit <i>impB-orfE</i> und <i>orfD1</i>	63
1.2.3.	Analysen zu OrfE (IglC _{F-W12}) und OrfD1 (VgrG _{F-W12})	65
1.2.3.1.	Antikörperherstellung.....	65
1.2.3.2.	Analysen zu OrfE (IglC _{W12}) in F-W12.....	66
1.2.3.3.	OrfE (IglC _{W12}) in <i>Fth</i> LVS und <i>Fno</i> U112	68
1.2.3.4.	Analysen zu OrfD1-Myc (VgrG _{W12}) in F-W12.....	71
1.2.3.5.	OrfD1-Myc (VgrG _{W12}) in <i>Fth</i> LVS.....	73
1.2.3.6.	OrfD1-Multimerbildung.....	76
1.2.4.	Verbleibt F-W12 im Phagosom?.....	77
1.3.	Suche nach Fitness- und Virulenzfaktoren („Scatterscreen“).....	79
1.3.1.	Scatterscreen mit einer F-W12 Tn5-Insertionsmutantenbank.....	80
1.3.2.	Persistenzassay	82
1.3.3.	Bestimmung der Tn5-Insertionsorte.....	86
1.3.3.1.	Identifizierte Gene des Stoffwechsels	90
1.3.3.2.	Identifizierte Gene der Zellhülle	91
1.3.3.3.	Weitere identifizierte Gene	93
1.4.	Stoffwechsel von F-W12.....	93
1.4.1.	Glucokinase-Mutante (Sc#50).....	94
1.4.2.	Myo-Inositol Stoffwechsel in F-W12	97
2.	Humanes <i>ex vivo</i> Lungeninfektionsmodell	102
3.	Molekularepidemiologische Studien zu <i>Francisella</i> in Deutschland.....	108
3.1.	<i>Fth</i> Isolate aus den Jahren 2016 - 2018.....	108
3.2.	Ein ungewöhnlicher Tularämie-Ausbruch in Deutschland	111
3.2.1.	Ausbruchsbeschreibung	111
3.2.2.	Nachweis von <i>Fth</i> DNA	113
3.2.3.	Identifikation der Kontaminationsquelle.....	116

IV. Diskussion	119
1. Charakterisierung des neues <i>Francisella</i> Isolates W12-1067	119
1.1. Suche nach einer potentiellen Wirtszelle	119
1.2. Alternatives Typ-VI-Sekretionssystem	122
1.2.1. Generierung und Komplementierung der Deletionsmutanten.....	124
1.2.2. Analysen zu OrfE (IglC _{W12})	125
1.2.3. Analysen zu OrfD1 (VgrG _{W12}).....	127
1.3. Verbleibt F-W12 im Phagosom?.....	131
1.4. Suche nach Fitness- und Virulenzfaktoren.....	132
1.4.1. Gene des Stoffwechsels.....	135
1.4.2. Gene der Zellhülle	137
1.4.3. Weitere identifizierte Gene	138
1.5. Stoffwechsel von F-W12.....	139
1.5.1. Glucokinase-Mutante (Sc#50).....	139
1.5.2. Myo-Inositol Stoffwechsel	140
2. Humanes <i>ex vivo</i> Lungeninfektionsmodell	142
3. Molekularepidemiologische Studien zu <i>Francisella</i> in Deutschland.....	147
3.1. Isolate aus den Jahren 2016 - 2018	147
3.2. Ein ungewöhnlicher Tularämie-Ausbruch in Deutschland	150
4. Fazit.....	154
Literaturverzeichnis.....	156
Publikationen	174
Anhang	175
Abkürzungsverzeichnis.....	189
Selbstständigkeitserklärung	192

Zusammenfassung

Francisella tularensis (*Ft*) ist ein gramnegatives, fakultativ-intrazelluläres Pathogen, welches die Tularämie beim Menschen und bei einer großen Anzahl von Tieren auslösen kann. In Deutschland ist ausschließlich die *Ft* Subspezies *holarctica* (*Fth*) für Infektionen im Menschen verantwortlich. Der Hauptvirulenzfaktor, die *Francisella* Pathogenitätsinsel (FPI), kodiert für ein Typ-VI-Sekretionssystem (T6SS) und ist für das Verlassen des Phagosoms und somit für die intrazelluläre Replikation verantwortlich. IglC und VgrG sind wichtige strukturelle Komponenten des T6SS, werden aber auch in Kulturüberständen nachgewiesen. VgrG scheint zudem auch eine Effektorfunktion wahrzunehmen. Deletionen von *iglC* und *vgrG* führen zur eingeschränkten T6SS-Funktionalität und damit zum intrazellulären Replikationsdefekt sowie zur Avirulenz der Deletionsmutanten. Kürzlich wurde ein aquatisches *Francisella* Umweltisolat in Deutschland gefunden, welches nicht zu *Ft* gehört. Das *Francisella* W12-1067 Isolat (F-W12) ist mit aquatischen *Allofrancisella* Stämmen aus China nah verwandt. F-W12 verfügt nicht über die FPI, dennoch konnten *in silico* putative *Francisella* Virulenzfaktoren und FPI-ähnliche Genominseln identifiziert werden, die für ein alternatives T6SS kodieren könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht das von F-W12 ausgehende Pathogenitätsrisiko besser zu verstehen. Trotz fehlender intrazellulärer Replikation war der F-W12 Stamm in der Lage in Makrophagen, Alveolarepithelzellen, *Acanthamoeba lenticulata* und im humanen Lungengewebe zu persistieren. Während der intrazellulären Persistenz-Phase scheint F-W12 das Phagosom in den Makrophagen nicht zu verlassen und verhält sich damit wie eine natürliche *Francisella* T6SS-Deletionsmutante. Die Untersuchungen zu den FPI-ähnlichen Genominseln in F-W12 zeigten, dass hier Genprodukte mit Homologien zu Proteinen einer anderen FPI-ähnlichen, aber noch wenig verstandenen Genominsel von *Francisella novicida* kodieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die F-W12 Homologen von *Francisella* IglC und VgrG exprimiert und sekretiert werden. Darüber hinaus konnte, wie bereits für VgrG von *Francisella* bekannt, die Bildung von VgrG_{W12}-Multimeren nachgewiesen werden.

Zur weiteren Risikoabschätzung des F-W12 Stammes wurden mithilfe des „Scatterscreens“ experimentell Faktoren bestimmt, die in der F-W12-Amöben-Interaktion involviert sind. Der Scatterscreen wurde ursprünglich für die Identifikation von Virulenzgenen in einer *Legionella* Transposon-Mutantenbank mithilfe von Amöben entwickelt. In dieser Arbeit wurden unter der Verwendung von *A. lenticulata* 29 putative Gene für die *Francisella*-Amöben-Interaktion identifiziert. Dabei konnten bereits für *Francisella* beschriebene Virulenzfaktoren (*relA*,

galU, *glpD*), Virulenzgene anderer Bakterien (*ftsH*, *mliA*, *mliD*) sowie F-W12-spezifische Faktoren gefunden werden.

Demzufolge verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Pathogenität des F-W12 Stammes nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann.

Durch die Transposon-Insertion wurde beim Scatterklon #50 die Glucokinase (*glk*) inaktiviert. Mithilfe von [U-¹³C₆]-Markierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass *glk* für die Verwertung von Glucose in F-W12 essentiell ist. Eine *glk*-Inaktivierung führte zum reduzierten *in vitro* Wachstum, welches durch die *trans* Komplementation mit *glk* wieder aufgehoben werden konnte.

Des Weiteren wurde *in silico* ein putatives Gencluster des Myo-Inositol-Stoffwechsels im F-W12 Stamm gefunden. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass Myo-Inositol als Energie- und Kohlenstoffquelle zum Wachstum im Wildtyp F-W12 verwendet wird. Im Gegensatz dazu konnte eine Deletionsmutante des Genclusters das Myo-Inositol nicht nutzen. Dieser Effekt war mithilfe der *trans* Komplementation des Gencluster komplementierbar. Zusätzlich konnte der Umsatz von ²H₆-Myo-Inositol durch Markierungsversuche bestätigt werden.

Als weiterführende Analyse der *Francisella* Virulenz wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *ex vivo* Lungeninfektionsmodell etabliert, welches es ermöglicht in einem komplexen 3D-System, die Replikation von verschiedenen *Francisella* Isolaten zu untersuchen. Dabei wurde der attenuierte Phänotyp des *Fth* Impfstammes gegenüber einem *Fth* Wildtypisolat erkennbar. Somit bot das *ex vivo* Lungeninfektionsmodell einen Vorteil gegenüber *in vitro* Infektionsmodellen, da *in vitro* der attenuierte Phänotyp generell nicht sichtbar wird.

Die molekularepidemiologischen Untersuchungen der Genome von 23 *Fth* Isolate aus den Jahren 2016 - 2019 offenbarten eine relativ große *Fth* Stammvielfalt innerhalb Deutschlands. Es wurden Vertreter beider in Europa verbreiteter phylogenetischer Kladen gefunden (B.6 und B.12). Des Weiteren war es möglich in Rahmen dieser Arbeit einen ungewöhnlichen Tularämie-Ausbruch bei einer Weintraubenlese in Deutschland zu untersuchen. Hierbei konnte die DNA des *Fth*-Ausbruchsstamms klassifiziert und die potentielle Kontaminationsquelle (Waldmaus) identifiziert werden.

Summery

Francisella tularensis (Ft) is a gram-negative bacterium and the causative agent of tularemia which affects humans and a broad range of animals. So far, only Ft subspecies *holarctica* isolates are found in Germany. The major virulence factor, the *Francisella* pathogenicity island (FPI), encodes a type VI secretion system which is essential for the intracellular replication and full virulence. The structural components IglC and VgrG are also found in culture supernatant which might reflect their potential as T6SS effectors, especially for VgrG. Deletion of either *iglC* or *vgrG* causes an avirulent phenotype due to the inability to replicate intracellularly. Recently, a new aquatic environmental *Francisella* isolate has been found in Germany. The isolate W12-1067 (F-W12) does not belong to Ft but is closely related to aquatic *Allofrancisella* isolates from China. *In silico* no FPI has been found in the genome of F-W12. Besides other putative virulence factors and two FPI-like genomic islands have been identified which might encode for an alternative T6SS.

This work focused on the investigation of the pathogenic potential of F-W12. Although intracellular replication was not found, F-W12 persists in macrophages, alveolar epithelial type II cells, *Acanthamoeba lenticulata* and human lung tissue. F-W12 was found to remain within the phagosome during the intracellular persistence phase in macrophages demonstrating high similarities to *Francisella* T6SS mutants. The FPI-like genomic islands of F-W12 encode proteins which revealed great identities to proteins of a FPI-like gene cluster in *Francisella novicida* which has not been characterized well so far. However, the F-W12 homologs of *Francisella* IglC and VgrG were expressed and secreted in F-W12. Furthermore, here it was demonstrated that VgrG_{W12} formed multimeres, a process which has already been described for *Francisella* VgrG.

In order to identify more putative virulence factors in F-W12 experimentally the scatter screen was established. Originally the method was used to identify *Legionella* transposon mutants deficient in infecting amoebae. *A. lenticulata* was used as a host for F-W12 and 29 putative genes involved in the F-W12 amoeba interaction were found. Thereby already known virulence factors of *Francisella* were identified (*relA*, *galU*, *glpD*) but also virulence genes of other bacteria (*ftsH*, *mliA*, *mliD*) and new putative F-12-specific factors.

Due to the results of this work, pathogenicity cannot generally be excluded for F-W12.

The scatter clone #50 possessed the transposon integration in a putative glucokinase gene (*glk*). [U-¹³C₆]-labeling experiments revealed that the glucokinase is essential for the metabolism of glucose in F-W12. An inactivation of the *glk* gene resulted in a reduced growth

phenotype of the mutant strain which was completely restored when *in trans* complemented with *glk*.

Moreover, a myo-inositol metabolizing gene cluster was identified in the genome of F-W12. In the context of this work it was possible to show that myo-inositol can be used as an energy and carbon source during growth of wildtype F-W12. In contrast, a mutant negative for the myo-inositol metabolizing gene cluster was unable to use myo-inositol. This effect was abolished by *in trans* complementation of the gene cluster. Also labeling experiment revealed the usage of $^2\text{H}_6$ -myo-inositol only in the wildtype.

To further analyze virulence differences between *Francisella* strains a new *ex vivo* infection model using human lung tissues was established allowing the investigation of *Francisella* replication within a complex 3D-system with various cell types. Here, the *Fth* Live Vaccine Strain showed an attenuated phenotype in comparison to the *Fth* wildtype strain. The replication difference has rarely been observed in *in vitro* infections using cell lines.

Between 2016 and 2019, 23 *Fth* isolates were obtained in Germany and molecular epidemiological studies of the *Fth* genomes indicated a great phylogenetic diversity among these strains. Isolates belonged to the phylogenetic groups B.6 and B.12 which are also found primarily in Europe. Furthermore, in the context of this work an unusual tularemia outbreak was investigated. Here, DNA of the *Fth* outbreak strain was classified and the potential contamination source (wood mouse) was identified.

I. Einleitung

1. *Francisella tularensis*

Francisella tularensis (*Ft*) ist ein gramnegatives, fakultativ-intrazelluläres Bakterium und stellt den Erreger der Tularämie dar, die beim Menschen und einer großen Anzahl von Tieren auftreten kann [1, 2]. Es besitzt eine Größe von etwa 0,2 - 1,7 µm, ist pleomorph und unbeweglich. Die ersten Berichte über das Auftreten einer Tularämie-ähnlichen Krankheit gehen bis auf das 19. Jahrhundert zurück [1, 3]. Das Bakterium wurde 1911 erstmals aus einem Erdhörnchen (Tulare County, Kalifornien) und 1914 aus einem Menschen (Ohio) in den USA isoliert [4, 5]. Anfänglich wurde es als *Bacterium tularense* bezeichnet (benannt nach Tulare County), jedoch wurde das Genus später zu Ehren von Edward Francis, der die erste umfangreiche Beschreibung zum Bakterium und der Krankheit vornahm, in *Francisella* umbenannt [1, 6]). Seit der Anthrax-Attacke von 2001 in den USA wurde die Forschung an *Ft* wieder intensiviert, da das Bakterium als ein potentiell bioterroristisches Agens der Kategorie A vom Zentrum für Seuchenkontrolle und -prävention und dem Nationalen Gesundheitsinstitut der USA eingestuft ist [6, 7]. Die Eingruppierung wird u.a. durch die hohe Virulenz von *Ft* (die minimale infektionsauslösende Dosis beträgt nur 10 Bakterien [8, 9]) und der leichten Transmission über Aerosole begründet.

1.1. Taxonomie und Epidemiologie

Die Familie *Francisellaceae* gehört zur γ -Subklasse der *Proteobacteria* und umfasst *Francisella* und *Allofrancisella* [1, 10, 11]. Innerhalb von *Allofrancisella* sind drei Spezies bekannt (*A. guangzhouensis*, *A. inopinata*, *A. frigidaquae*). In *Francisella* sind neben *F. tularensis* (*Ft*) bisher 14 weitere Spezies beschrieben: *F. novicida* (*Fno*), *F. hispaniensis*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis*, *F. asiatica*, *F. haliotica*, *F. marina*, *F. persica*, *F. frigiditurrensis*, *F. opportunistica*, *F. salina*, *F. uliginis*, *F. endociliophora* und *F. adeliensis* [1, 4, 12-23]. Die einzelnen Arten können frei in der Umwelt (im Boden, in Salz- oder Süßwasser) und/oder mit anderen Organismen assoziiert vorkommen. *F. noatunensis* ist beispielsweise ein Fischpathogen und *Ft*, *Fno*, *F. philomiragia* und *F. hispaniensis* stellen Tier- und Humanpathogene dar, wobei Infektionen mit *Fno*, *F. philomiragia* und *F. hispaniensis* nur in immungeschwächten Menschen dokumentiert sind [23-30]. Darüber hinaus wird die Klassifizierung von *Fno* als eigene Art oder *Ft* Subspezies kontrovers diskutiert [17, 31, 32]. Aufgrund der metabolischen, genetischen und phänotypischen Unterschiede zu *Ft* wird *Fno* in dieser Arbeit als eigene Spezies geführt.

Innerhalb der Spezies *Ft* gibt es drei Subspezies *Ft* ssp. *tularensis* (*Ftt*), *Ft* ssp. *holarctica* (*Fth*) und *Ft* ssp. *mediasiatica* [33], von denen hauptsächlich *Ftt* und *Fth* für den Menschen klinisch relevant sind. *Ftt* (auch als Typ A bezeichnet) ist in Nordamerika verbreitet und hochvirulent (die minimale Infektionsauslösende Dosis beträgt zehn Bakterien [8, 9]), wobei es auch hier zwei Genotypen (Typ A.I und A.II) mit unterschiedlicher geografischer Verteilung, Übertragungswegen und Krankheitsverläufen gibt [34, 35]. *Ftt* A.I ist vorrangig im Osten der USA verbreitet und besitzt eine Mortalitätsrate bis zu 14 % beim Menschen [34-36]. Im Gegensatz dazu ist *Ftt* A.II. weniger virulent (Mortalitätsrate liegt bei 0 % [35] und vorrangig im Westen der USA zu finden [34, 35]. Die Subspezies *Fth* (Typ B) ist weniger virulent, auf der gesamten Nordhemisphäre verbreitet und für die Tularämie-Fälle in Europa verantwortlich. In Nordamerika machen die durch *Fth* ausgelösten Tularämie-Fälle nur etwa 30 % aus [35]. Kürzlich wurden vereinzelte *Fth* Isolate auch in Australien gefunden [37-40]. Innerhalb von *Fth* werden die Biovar I (Erythromycin-sensitiv), II (Erythromycin-resistent) und Japonica (Glycerol-fermentierend) unterschieden. Biovar I und II sind in Europa verbreitet und Vertreter des Biovar Japonica kommen größtenteils in Japan, aber auch in China und der Türkei vor [41-43]. Das Genom von *Fth* ist relativ klein (etwa 1,89 Mb) und verfügt über eine geringe Diversität innerhalb der einzelnen Stämme [44]. Basierend auf der Analyse der konservierten kanonischen Einzelnukleotid-Polymorphismus („canonical single nucleotide polymorphisms“, canSNP) werden innerhalb von *Fth* vier phylogenetische Hauptgruppen (B.4, B.6, B.12 und B.16) und viele Subkladen unterschieden [44-46]. Die Kladen B.4 und B.6 sind vorrangig in Westeuropa verbreitet und gehören zum Biovar I [1, 47, 48]. In Nord- und Osteuropa sind größtenteils Isolate der Klade B.12 zu finden, welche zum Biovar II zählen [44, 48, 49].

1.2. Wirte und Übertragung

Francisella ist in der Lage eine Vielzahl von Organismen zu infizieren, darunter befinden sich Vertebraten (wie Säugetiere, Vögel und Fische), Arthropoden und Protisten [50, 51]. Wildtiere, insbesondere kleine Nagetiere und *Lagomorpha*, stellen vermutlich ein natürliches Reservoir von *Ft* und eine potentielle Quelle zur Übertragung auf den Menschen dar [52]. In Europa sind die Vertreter der *Leporidae*, speziell des Genus *Lepus* (z.B. *Lepus europaeus*, *Lepus timidus*) ein Reservoir von *Ft* [51]. Neben den Hasenartigen kann *Ft* ebenso vielen kleinen Nagetieren infizieren, u.a. *Sciuridae* (Eichhörnchen), *Castoridae* (Biber, besonders *Castor fibre*), *Cricetidae* (Hamster, Lemminge, Wühlmäuse) und *Muridae* (Mäuse, Ratte, inkl. der Gattung *Apodemus*). Darüber hinaus können Haustieren (z.B. Schafe, Katzen, Hunde)

ebenso Träger von *Ft* sein [50, 53-55]. Generell werden jedoch Karnivore nicht als Hauptübertragungsquelle angesehen. Vereinzelt werden auch Wildvögel positiv auf *Ft* getestet, z.B. einige Schwalben-, Enten- und Möwenarten, jedoch werden sie nur sehr selten mit humanen Tularämie-Fällen in Verbindung gebracht [50]. Des Weiteren stellen einige Süß- und Salzwasserfische, wie z.B. *Tilapia* ssp. und *Gadus morhua* (Dorsch) ein natürliches Reservoir von *F. noatunensis* dar [26, 56, 57]. Es wurden jedoch noch keine humanen Infektionen mit *F. noatunensis* beschrieben und *in vivo* Infektionsversuche zeigten, dass die Spezies avirulent für Mäuse ist [24]. Im Gegensatz dazu stellen blutsaugende Arthropoden wichtige *Ft* Vektoren dar. Bisher wurde *Ft* in Zecken (z.B. aus den Gattungen der *Dermacentor*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*), Mücken (z.B. *Aedes* Spezies), Fliegen, Flöhe und Milben nachgewiesen [41, 47, 51, 52, 58].

Bisher sind nur direkte oder indirekte *Ft* Übertragungen von infizierten Tieren auf den Menschen beschrieben, eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung wurde noch nicht dokumentiert [1]. Eine direkte Übertragung des Bakteriums kann durch den Kontakt mit einem infiziertem Tier bzw. Kadaver erfolgen [59, 60]. Da *Ft* relativ lange in der Umwelt überleben kann, ist eine Aufnahme des Erregers durch kontaminierte Erde, Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser möglich, aber auch die Inhalation von infektiösen Aerosolen oder Staub ist beschrieben [2, 61-63]. Ebenso kann eine Übertragung von *Ft* auf den Menschen durch Arthropodenbisse oder -stiche, z.B. von Zecken und Mücken, erfolgen [59].

2. Tularämie

2.1. Tularämie beim Menschen

Die Tularämie, auch Hasenpest oder Lemmingfieber genannt, ist durch ein unspezifisches und vielseitiges klinisches Krankheitsbild gekennzeichnet und besitzt eine Inkubationszeit von 3 Tagen bis zu 3 Wochen [2, 64, 65]. Die ersten Symptome sind Grippe-ähnlich, wie z.B. Fieber, Schüttelfrost, geschwollene Lymphknoten, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen. Häufig ist die Tularämie eine langanhaltende und stark schwächende Krankheit. Abhängig von der Eintrittspforte des Bakteriums unterscheidet man verschiedene Formen der Tularämie. Eine der häufigsten Formen ist die oropharyngeale Tularämie, die zumeist nach der oralen Aufnahme des Erregers durch kontaminiertes Wasser oder Lebensmittel auftritt und durch eine chronische Rachenentzündung, einer zumeist schmerzvollen Lymphknotenschwellung (Lymphadenopathie) und Bildung von Schleimhautgeschwüren charakterisiert ist [1, 59, 65]. Wenn eine große Menge des Bakteriums aufgenommen wurde, kann ebenfalls der Gastrointestinaltrakt involviert sein, was sich durch weitere Symptome wie

Durchfall und Bauchschmerzen äußert [1, 64]. Die ulzeroglanduläre Tularämie tritt durch Hautkontakt mit dem Erreger auf (auch ohne offene Wunden) oder durch Arthropodenstiche und -bisse. Das klinische Krankheitsbild ist hier durch Hautgeschwüre (Ulcus, häufig langanhaltend oder chronisch) kombiniert mit einer lokalen Lymphadenopathie des angrenzenden Lymphknotens gekennzeichnet [1, 64]. Wenn nur eine Lymphadenopathie ohne Hautgeschwürbildung auftritt, spricht man von einer glandulären Tularämie. Zu einer Infektion des Auges, einer daraus resultierenden Bindehautentzündung sowie ggfs. einer lokalen Lymphadenopathie kann es durch die Übertragung von *Ft* kommen (oculoglanduläre Form, [66]). Bei der Inhalation von kontaminierten Aerosolen kann sich die pulmonale Tularämie ausbilden, was bis zur Manifestation einer Pneumonie führen kann. Sie stellt eine der schwersten Formen der Tularämie dar und besaß vor der Entwicklung der Antibiotika eine Letalität zwischen 30 - 60 % [67], heute sind es < 2 % [68]. Jedoch kann sich der Erreger über das Blut auch im gesamten Körper ausbreiten und somit ebenfalls zu einer Lungenentzündung führen [59, 60]. Darüber hinaus können sich nekrotische, Tuberkulose- oder Tumor-ähnliche Granulome im Lungengewebe infolge einer *Ft* Infektion ausbilden [69, 70]. Eine weitere, jedoch seltene Form der Tularämie, ist die Typhus-ähnliche Form, hierbei handelt es sich um eine schwere systemische Erkrankung mit einem zumeist akuten Ausbruch, hohem Fieber und neurologischen Symptomen (wie z.B. Verwirrung und Verhaltensänderungen) ohne Lymphadenopathie oder Geschwüre [59, 64]. Weitere Komplikationen, die generell im Zusammenhang mit einer Tularämie auftreten können, sind beispielsweise Hautausschlag, Abszesse des Weichgewebes, Vereiterung der Lymphknoten (tritt bei etwa 30 % der Patienten mit Lymphadenopathie auf), Mittelohrentzündung und Hirnhautentzündung [59, 64].

2.2. Tularämie bei Tieren

Das klinische Bild und die Pathologie von natürlichen Tularämie-Fällen in Tieren fehlen fast vollständig in der Literatur [51]. Bekannt ist jedoch, dass die Tularämie in Tieren ebenso durch ein unspezifisches Krankheitsbild gekennzeichnet ist und zu meist letal verläuft [50, 59]. Besonders Tiere mit einer hohen Anfälligkeit für *Ft* (z.B. Hausmaus (*Mus musculus*), einige Hasenarten) bilden eine akute Infektion mit einer starken Vergrößerung der inneren Organe und einer Sepsis aus [59, 71]. Eine etwas mildere Form wird z.B. beim Europäischen Feldhasen beobachtet. Hier bilden sich chronische Läsionen und granulomatöse Entzündung vorrangig in der Lunge und Niere. Darüber hinaus gibt es auch Säugetiere, bei denen eine Infektion mit schwächeren klinischen Symptomen auftritt, dazu zählen beispielsweise Hunde,

Katzen, Rotfuchs und Wildschwein [52, 59, 72]. Des Weiteren wird bei Fischen eine Tularämie-ähnliche Krankheit beobachtet, die Francisellose. Sie tritt weltweit in Kultur- und Wildfischen auf und löst ebenso eine granulomatöse Entzündung in multiplen Organen, aber insbesondere der Niere und Milz, aus [73, 74].

2.3. Diagnose, Behandlung und Prävention

Aufgrund des unspezifischen und vielfältigen Krankheitsbildes der Tularämie kommen eine Vielzahl weiterer Krankheiten ebenso in Betracht, wie z.B. Influenza, Legionellose und Brucellose. Dadurch ist eine zeitliche Verzögerung der Diagnose nicht selten [2, 75]. Die Differentialdiagnose beinhaltet die Detektion spezifischer Antikörper (Serologie), den Antigennachweis und/oder die Detektion des lebenden Erregers oder der Erreger-DNA [2, 65, 76]. Zum Nachweis spezifischer Serumantikörper können verschiedene Methoden, wie „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) und Agglutinationstest, verwendet werden. Der Nachweis erfolgt indirekt entweder durch einen einmaligen hohen Antikörpertiters oder durch Ansteigen des Titers während der Infektion. Jedoch sind erst nach ein bis zwei Wochen nach Krankheitsbeginn klinisch relevante Antikörpertiter detektierbar und nach drei bis vier Wochen ist das Maximum erreicht [2, 65, 76]. Demnach ist der Nachweis durch spezifische Antikörper erst relativ spät möglich. Der Antigennachweis kann mittels ELISA oder Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgen. Die Detektion des Erregers aus einem Patienten ist in wenigen Fällen erfolgreich, da zumeist bereits mit der Antibiotika-Therapie begonnen wurde. Die Detektion der Erreger-DNA erfolgt durch PCR-basierende Methoden (klassische, Real-Time, Multiplex-PCR, [59]. Der PCR-Nachweis kann aus den verschiedensten klinischen Proben erfolgen (z.B. Blut/Serum und Lymphknotenbiopsie). Als Zielgene zum Nachweis von *Ft* DNA werden u.a. die *Ft* Gene *tul4* (Oberflächenprotein), *fopA* (Außenmembranprotein), *lpnA* (Lipoprotein) und die Insertionssequenz *ISFTu2* verwendet [59]. Die Bestimmung der Subspezies oder des Genotyps ist ebenso möglich. Ein Beispiel hierfür ist die von Broekhuijsen et al. etablierte PCR zur Differenzierung der *Ft* Subspezies (*Fth*, *Ftt*, *Fth japonica*, *Fth mediasiatica*) und der Spezies *Fno* anhand der Amplifikation der „Region of Differentiation 1“ (RD1) resultierend in spezifische PCR-Produktgrößen [77].

Nur die wenigsten *Ft* Infektionen verlaufen tödlich und viele Patienten können ohne Behandlung genesen [1]. Wenn erforderlich werden zur Behandlung der Tularämie Antibiotika eingesetzt. Bisher sind keine natürlichen Resistenzen gegen Primärantibiotika in *Francisella* bekannt. Da *Ft* ein β -lactam-Produzent ist, können β -lactam-Antibiotika nicht zur Behandlung eingesetzt werden [64, 65, 76, 78]. Für die Behandlung von Tularämie-Patienten

werden Aminoglycoside (Streptomycin, Gentamicin), Fluoroquinolone (Ciprofloxacin) und Tetracycline (Doxycyclin) verwendet [64, 65, 76]. Als Antibiotika erster Wahl bei einer mild bis moderat verlaufenden Tularämie werden Fluoroquinolone und Tetracycline für zwei bis drei Wochen verwendet. Bei schweren Krankheitsverläufen wird Gentamicin eingesetzt. Komplikationen, Rückfälle und/oder ein Ausbleiben des Behandlungserfolges sind in Patienten mit vereiterten Lymphknoten keine Seltenheit und erfordern daher häufig eine langfristige Therapie [2, 75].

Eine Präventivimpfung gegen die Tularämie gibt es nicht, obwohl bis vor einigen Jahren der *Fth* LVS („Life Vaccine Strain“) Impfstamm zur Immunisierung eingesetzt wurde [79]. Dieser Stamm wurde in der ehemaligen Sowjetunion durch mehrmaliges Passagieren eines *Fth* Isolates durch Mäuse gewonnen [80]. Heutzutage wird dieser Impfstoff nicht mehr genutzt, da die Wirksamkeit, insbesondere gegen *Fth* Inhalation, als zu gering und das Rückkehrisiko zur Virulenz als zu groß eingeschätzt wird. Es wird weiter nach einem geeigneten Impfstoff geforscht, jedoch ist noch keiner für die Verwendung beim Menschen zu gelassen [59].

2.4. Verbreitung der Tularämie

Die Tularämie stellt eine seltene Erkrankung dar und ist in den meisten europäischen Ländern und in den USA eine meldepflichtige Krankheit, die beispielsweise in Deutschland dem Gesundheitsamt des jeweiligen Bundeslandes gemäß des Infektionsschutzgesetzes und des Tiergesundheitsgesetzes gemeldet werden muss. Nichtsdestotrotz wird die Tularämie als unterdiagnostiziert und unterregistriert erachtet [2, 81]. Die Tularämie kommt auf der gesamten Nordhemisphäre vor und ist in Schweden, Finnland, und Russland endemisch [82]. In den meisten anderen europäischen Ländern werden nur sehr wenige bis wenige Fälle pro Jahr gemeldet, dazu zählen u.a. Deutschland (41 Fälle in 2016, [2]) und Frankreich. In den letzten Dekaden sind größere Tularämie-Ausbrüche im Kosovo, in Spanien und in Schweden aufgetreten [61, 62, 83, 84]. Im Jahr 2016 trat ein ungewöhnlicher Tularämie-Ausbruch in Deutschland bei einer Traubenlese auf, bei dem sechs Patienten erkrankten ([85], diese Arbeit). Allgemein ist das Auftreten der Tularämie jedoch mit unzureichenden hygienischen Bedingungen assoziiert, wie sie häufig in Zusammenhang mit kriegesischen Auseinandersetzungen zu finden sind. Während und nach dem 2. Weltkrieg traten beispielsweise vermehrt Tularämie-Fälle in Deutschland auf (1949 - 1959: 515 Tularämie-Fälle [2]). Des Weiteren werden in der Türkei, Japan und China ebenso jährlich Tularämie-Fälle registriert [43]. In Nordamerika werden Fälle in Kanada, den USA (jährlich etwa 100

Fälle) und vereinzelt im Norden von Mexico gemeldet [34]. Die südliche Hemisphäre ist weitgehend Tularämie-frei, es wurden nur vereinzelt Fälle in Australien dokumentiert [37-40].

3. Wirt-Pathogen-Interaktion

Während einer Infektion kommt *Ft* zunächst mit den extrazellulären Abwehrmechanismen des Wirts in Kontakt [86, 87]. Dabei handelt es sich vorrangig um Komplementkomponenten und Antikörper. Deren Aufgaben bestehen darin, den Erreger zu opsonieren, ggfs. zu lysieren, sowie weitere Immunzellen anzulocken und zu aktivieren [88]. *Francisella* hat verschiedene Strategien entwickelt sich diesen ersten Abwehrmechanismen des Wirtes zu entziehen. Die Expression einer atypischen Bakterienoberfläche (z.B. durch Kapselbildung) limitiert beispielsweise die Antikörper- und Komplementbindung ([89-91], siehe unten I.4). Des Weiteren ist *Ft* in der Lage eine Vielzahl verschiedener Wirtszellen zu infizieren. Dazu zählen phagozytierende Zellen, wie Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen und Monozyten sowie nicht-phagozytierende Zellen, wie Epithelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten und Erythrozyten [86, 92-96].

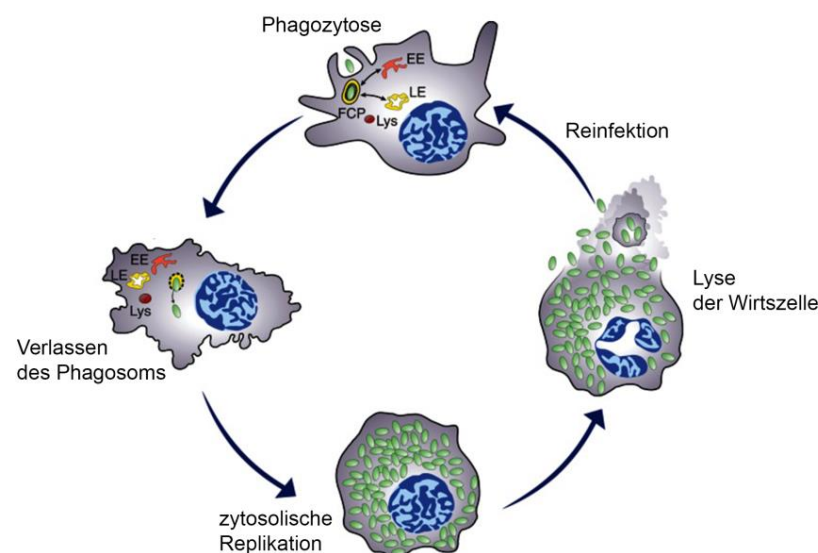


Abb. 1: Intrazellulärer Lebenszyklus von *Francisella* in Makrophagen. Der intrazelluläre Lebenszyklus beginnt mit der Phagozytose und der Formation eines Phagosoms, auch „*Francisella* containing Phagosome“ (FCP) genannt. Das FCP interagiert mit endosomatischen Komponenten (frühes („early“, EE) und spätes („late“, LE) Endosom), jedoch nicht mit dem Lysosom (Lys). Die Bakterien gelangen durch die Lyse der Phagosommembran in das Zytosol der Wirtszelle, wo sie anschließend massiv replizieren. Der intrazelluläre Lebenszyklus endet mit der Lyse der Wirtszelle, woraufhin die Bakterien neue Zellen infizieren können. Verändert nach Celli et al. 2013 [97].

Die intrazelluläre Phase von *Ft* beginnt mit der Adhärenz an die Zielzelle. Die daran beteiligten Faktoren und genauen Mechanismen sind jedoch noch wenig verstanden. In vielen intrazellulären Bakterien fördern Pili des Typ IV die Anheftung an die Wirtszellen [98, 99]. In *Francisella* wurden Pili des Typ IV Homologe gefunden (siehe I.4.3), jedoch konnte deren Einfluss auf die Adhäsion an die Wirtszelle noch nicht eindeutig belegt werden [100-105]. Die Aufnahme und die anschließende intrazelluläre Replikation der *Ft* Bakterien sind zum Teil abhängig von der Opsonierung des Bakteriums und des Wirtszelltyps [86, 92, 106]. Dementsprechend ist eine Vielzahl an Wirtszellrezeptoren beschrieben, die in der Erkennung und Interaktion mit *Ft* involviert sind. Dazu zählen Toll-ähnliche Rezeptoren („Toll-like receptor“, TLR, TLR2, TLR6 und TLR4), Komplementrezeptoren (CR, CR3, CR4, CR1), der Mannose-Rezeptor, der Fc- γ -Rezeptor und der Scavenger-Rezeptor der Klasse A [86, 92, 96, 107].

Zur Internalisierung von *Francisella* nutzen die Wirtszellen vorrangig die Phagozytose, aber auch Makropinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose sind beschrieben [95, 108, 109]. Bei der *Ft* Internalisierung wurde eine besondere Form der Phagozytose beobachtet, die sogenannte „Looping“-Phagozytose [106, 110, 111]. Hierbei bildet sich ein asymmetrisches Pseudopodium der Wirtszellmembran aus und umschließt das Bakterium. Dieser Vorgang ist der Makropinozytose sehr ähnlich. Bei beiden Formen werden die Membranbewegungen von den Aktin- und Myosinfilamenten ausgeführt [106, 110, 112, 113]. Ebenso konnte die Bedeutung von Cholesterol-reichen Lipid-Rafts in der Aufnahme von *Ft* gezeigt werden [92, 93]. Generell stellen Makrophagen die primären Wirtszellen von *Francisella* dar und diese bilden prinzipiell die erste zelluläre Abwehr gegen eindringende Bakterien [114, 115]. Nach der Phagozytose wird in den Makrophagen ein Phagosom gebildet, welches heranreift und mit dem Endosom und Lysosom fusioniert, wodurch Hydrolasen und Proteasen zum Abtöten des Erregers bereitgestellt werden. Als Abtötungsmechanismen werden im Phagosom reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale gebildet und der pH-Wert abgesenkt, folglich wird der Erreger eliminiert. Die intrazellulären *Ft* behaupten sich gegen die intraphagozytären Abtötung, gelangen ins Zytosol der Wirtszelle und vermehren sich dort. *Francisella* inhibiert die Phagosomenreifung, die Phagosomlysosomverschmelzung und hemmt u.a. die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikale im Phagosom [116-119]. In dieser Phase wird die Expression von Stress- und Virulenzgenen erhöht, insbesondere werden die Gene der *Francisella* Pathogenitätsinsel (FPI) verstärkt exprimiert (siehe unten, [120, 121]. Nur wenige Stunden nach der Infektion gelangt *Ft* in das Zytosol der Wirtszelle [107, 116, 120, 122, 123]. Die genauen Mechanismen für die Evasion aus dem Phagosom sind noch nicht gut

verstanden, jedoch konnte gezeigt werden, dass die FPI-Gene eine entscheidende Rolle spielen [110, 124, 125]. Es wird vermutet, dass die FPI für ein Typ-VI-Sekretionssystem (T6SS) kodiert, welches vermutlich die Lyse der Phagosommembran vorantreibt (siehe unten). Generell ist der intrazelluläre Zyklus abhängig von der Wirtszelle und der *Francisella* Spezies bzw. Subspezies. Die intrazelluläre Replikation endet mit der Lyse der Wirtszelle, wodurch die freiwerdenden Bakterien weitere Zellen infizieren können. Darüber hinaus ist die Transmission von *Ft* durch eine direkte Zell-Zell-Übertragung *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Trogozytose, [126, 127]). Dabei werden die Bakterien in doppelmembranhaltigen Vesikeln direkt vom Zytosol einer infizierten Zelle an eine Nachbarzelle weitergegeben, ohne dass die Donorzelle dabei stirbt.

Während einer *Ft* Infektion unterdrückt *Ft* die Immunabwehr des Wirts, indem u.a. die Produktion von immunsupprimierende Zytokine induziert und die Sekretion von pro-inflammatorische Zytokine gehemmt wird [108, 128-131]. Dadurch werden die inflammatorischen Immunzellen verzögert rekrutiert und es kommt zum zeitlichen Verzug der Immunantwort [117, 129, 131]. Welche zellulären Prozesse *Francisella* nutzt, um die Immunabwehr des Wirtes zu modulieren, sind noch nicht identifiziert [92, 108]. Die FPI-Gene scheinen aber einen direkten oder indirekten Einfluss zu haben [132]. Im Allgemeinen verfügt *Francisella* über eine dominierende intrazelluläre Phase während der Infektion, dennoch kann *Ft* auch extrazellulär vorliegen [133, 134]. In dieser Phase ist *Ft* „sensibel“ für Antikörper, die vorrangig Bestandteile der Lipopolysaccharide und von Außenmembranproteinen erkennen. Dennoch scheinen die antikörperproduzierenden B Zellen eine untergeordnete Rolle in der Immunität gegen *Francisella* zu besitzen [135]. Die erworbene Immunität gegen *Francisella* beruht größtenteils auf die T Zell-vermittelte Immunabwehr [130, 136].

4. Virulenzfaktoren von *Francisella*

In *Francisella* wurde eine Vielzahl von Faktoren identifiziert, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Pathogenität und Virulenz besitzen. Dazu zählen u.a. die Kapsel, die *Francisella* Lipopolysaccharide (LPS), die Pili des Typ IV (Typ-IV-Pili) und besonders die *Francisella* Pathogenitätsinsel ([100], siehe Abb. 2).

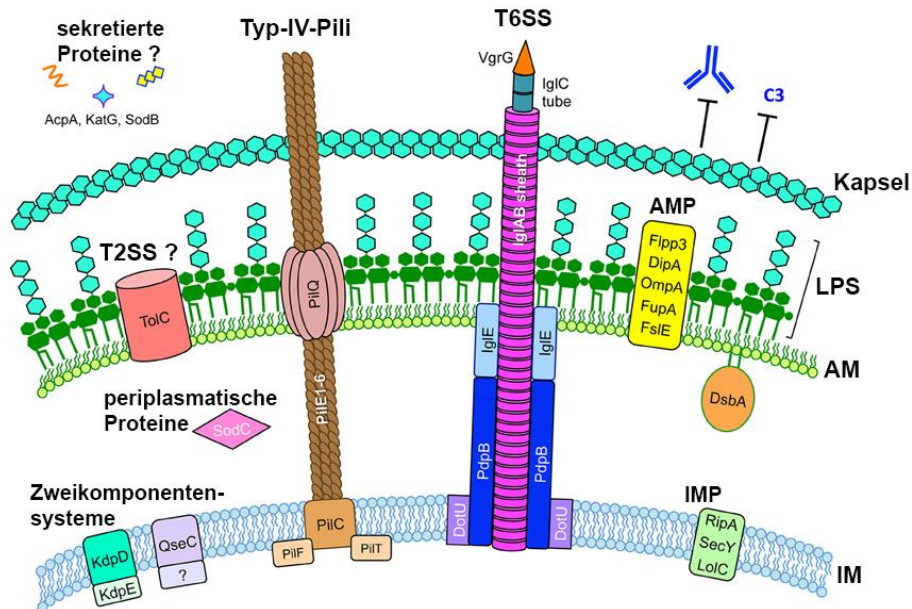


Abb. 2: Darstellung der Virulenzfaktoren in der *Francisella* Bakterienhülle. Von außen nach innen sind die Kapsel, die Lipopolysaccharide (LPS), die Außen- (AM) und Innenmembran (IM) von *Francisella* sowie deren Virulenzfaktoren dargestellt. Ein Hauptvirulenzfaktor stellt das Typ-VI-Sekretionssystem (T6SS) dar, welches durch die *Francisella* Pathogenitätsinsel kodiert wird. Es bildet ein kontraktiles Sekretionssystem für die Abgabe von Effektorproteinen und wird u.a. aus den Proteinen DotU, PdpB, IglE, IglA, IglB, IglC und VgrG gebildet. Die genaue Funktionsweise und die Effektoren sind noch nicht identifiziert. Das *Francisella* LPS unterscheidet sich vom prototypischen LPS gramnegativer Bakterien. Es ist tetra-acyliert, besitzt lange Acylketten und verfügt über eine fehlende oder einfache Phosphorylierung. Dadurch ist es nur schwach immunogen. Die Kapsle von *Francisella* ist mit den LPS-O-Antigenen identisch und verhindert vermutlich die Antikörper- und Komplementbindung. In *Francisella* wurden Typ-IV-Pilus-ähnliche Strukturen identifiziert, die einen Einfluss auf die Virulenz besitzen. Weiter wurden Virulenzfaktoren in der inneren Membran (Bsp. Zweikomponentensysteme), im Periplasma und in der äußeren Membran gefunden. Für weiterführende Informationen siehe Text. Verändert nach Rowe et al. 2015 [100].

4.1. Kapsel

Bei vielen Bakterien ist die Zellhülle zusätzlich von außen mit einer dicken Polysaccharid- oder Proteinschicht umgeben, die als Bakterienkapsel bezeichnet wird. Die Polymere verhindern die Diffusion von gelösten Substanzen zur Zellhülle und sind an diese nichtkovalent gebunden. Die Kapsel ist nicht überlebensnotwendig für Bakterien, jedoch spielt sie eine entscheidende Rolle als Virulenzfaktor bei pathogenen Bakterien [100]. Dabei beeinflusst sie einerseits die Anheftung an die Wirtszelle und andererseits verhindert sie die Phagozytose und die Opsonierung mit Antikörpern oder Komplementfaktoren, wodurch sie vor der Immunerkennung und der komplementgesteuerten Lyse schützt. Besonders intrazelluläre Bakterien nutzen häufig Kapseln um unbemerkt in die Wirtszelle einzudringen, die Immunantwort zu unterdrücken und das eigene Überleben zu sichern [100]. Im Kontrast

dazu steht die immunogene Wirkung des Kapselmateri als einiger Bakterien und dessen Verwendung als Antigene für die Impfstoffgenerierung.

Francisella verfügt über eine 0,02 - 0,04 µm dicke Kapsel-ähnliche Struktur, die aus makromolekularen (100 - 250 kDa) Polysacchariden besteht und mit den O-Antigenuntereinheiten des *Francisella* LPS identisch ist (siehe Abb. 2, [137, 138]). Andere LPS-Komponenten fehlen jedoch in der Kapsel [138]. Die Kapselproduktion ist in vielen *Francisella* Stämmen konserviert, jedoch kann die Zusammensetzung variieren. In *Fth* LVS besteht der Kapsel-ähnliche Komplex beispielsweise aus Mannose, Glucose und Galaktose wohingegen bei *Ftt* Schu S4 die Polysaccharide Mannose und Rhamnose zu finden sind [137]. Die Kapsel stellt einen wichtigen Virulenzfaktor von *Francisella* dar, da kapsellose Mutanten *in vitro* und *in vivo* stark attenuiert sind [89, 137, 139, 140]. Das Operon *capBCA*, welches Homologien zu Kapselgenen in anderen Bakterien aufweist, scheint in *Francisella* nicht an der Kapselproduktion beteiligt zu sein, jedoch ist es für die Virulenz essentiell [138]. Die genaue Funktion der Kapsel in der *Francisella* Virulenz ist noch nicht eindeutig geklärt. Einige Versuche weisen darauf hin, dass sie die Antikörper- und Komplementbindungen blockiert und die Serumresistenz erhöht [89-91]. Darüber hinaus ist die Existenz einer *Francisella* Kapsel nicht eindeutig belegt, da die Kapsel O-Antigene ebenso freie O-spezifische Polysaccharidketten des LPS sein könnten, die nah an der Bakterienoberfläche aggregiert [100].

4.2. LPS

Das LPS bildet in den meisten gramnegativen Bakterien die äußere Schicht der Außenmembran und besteht aus drei Komponenten, die von außen nach innen als O-Antigen (O-spezifische Polysaccharidkette), Kernpolysaccharidregion und Lipid A bezeichnet werden. Die O-Antigene des LPS von *Ftt* und *Fth* besitzen die gleichen Polysaccharidketten, jedoch sind sie abweichend in *Fno* (siehe Abb. 2, [100, 141-146]). Grund dafür sind die konservierten *wzy*, *wzx*, *wbt* Gencluster, welche in *Ftt* und *Fth* über insgesamt 15 O-Antigen-ORFs und in *Fno* über 12 Gene verfügen [141, 145]. Das O-Antigen ist essentiell für die vollständige *Francisella* Virulenz, jedoch nicht für die intrazelluläre Replikation in Makrophagen [145, 147]. Es wurde gezeigt, dass *Fth* LVS die Expression der O-Antigen- und Kapselkohlenhydrate verändern kann [148]. Des Weiteren besitzt die *Francisella* Kernpolysaccharidregion nur ein 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (KDO)-Molekül zur Verankerung mit dem Lipid A im Gegensatz zu prototypischen LPS-Strukturen, die in der Regel zwei KDO-Moleküle aufweisen [142-144]. Die in *Francisella* gefundene putative

Kern-Oligosaccharid-KDO-Transferase KdtA stellt einen weiteren Virulenzfaktor dar, da *Ftt* Schu S4 $\Delta kdtA$ Deletionsmutanten avirulent in Mäusen sind [149]. Das LPS von *Francisella* weist ein konserviertes aber atypisches Lipid A auf [144, 146]. Im Gegensatz zum prototypischen hoch immunogenen Lipid A gramnegativer Bakterien, welches hexa-acyliert und di-phosphoryliert ist, sowie kurze Acylketten (12 bis 14 Kohlenstoffen) besitzt, ist das *Francisella* Lipid A tetra-acyliert und besitzt lange Acylketten (16 - 18 Kohlenstoffatome). Aufgrund der untypischen Lipid-A-Komposition ist das LPS von *Francisella* nur schwach immunogen. Darüber hinaus verfügt das Lipid A in *Francisella* über einer einfachen oder sogar fehlenden Phosphorylierung [146, 150, 151]. Es konnte gezeigt werden, dass das Lipid A in *Francisella* zunächst di-phosphoryliert vorliegt, jedoch wird die Phosphorylierung aktiv durch zwei Phosphatasen (LpxE, LpXF) entfernt [152, 153]. Diese aktive Dephosphorylierung stellt ein Virulenzmechanismus in *Francisella* dar, da $\Delta lpxF$ Mutanten *in vitro* und *in vivo* avirulent sind [154].

4.3. Typ-IV-Pili

Als Pili werden kurze dünne Zellanhängsel bezeichnet, die der Adhäsion, Aggregation, Fortbewegung oder DNA-Aufnahme dienen und in vielen gramnegativen Bakterien ein Virulenzfaktor darstellen (Bsp. *Pseudomonas aeruginosa*, [155]). Die Fasern des Pilus werden aus vielen Kopien des Pilins (PilA) gebildet. Im Genom von *Francisella* wurden Gencluster identifiziert, die Homologien zu den Typ-IV-Pilus-Genen von *Pseudomonas* und *Neisseria* aufweisen [156, 157]. Dabei handelt es sich um putative Außen-, Innenmembran- und Pilinproteine sowie einer ATPase. Darüber hinaus konnten Pilus-ähnliche Strukturen in *Fth* LVS, *Ftt* Schu S4 und *Fno* beobachtet werden (siehe Abb. 2), die scheinbar Stamm- und/oder Versuchsabhängig exprimiert werden [103-105, 156, 158, 159]. Die Pilus-ähnlichen Strukturen werden in *Francisella* aus fünf bis sechs Pilin-Untereinheiten (Pile1 bis Pile6) gebildet, wobei die einzelnen Pilinproteine Unterschiede zwischen den Stämmen aufweisen [105, 156, 158]. Das Pilinprotein Pile1 (Homolog zu PilA) und einige Proteine, die an der Assemblierung des Typ-IV-Pilus beteiligt sind, sind für die vollständige Virulenz von *Ftt* Schu S4 und virulenten *Fth* Stämmen essentiell [102, 159]. Zwar konnte eine Assoziation der Pilus-Expression mit der Virulenz festgestellt werden, jedoch ist die genaue Funktion des Typ-IV-Pili in *Francisella* nicht bekannt, da es scheinbar keine Rolle in der Adhäsion, Aggregation, Fortbewegung oder DNA-Aufnahme spielt [100].

4.4. *Francisella* Pathogenitätsinsel

Die *Francisella* Pathogenitätsinsel (FPI) wurde erstmals 2004 von Nano und Kollegen als Gencluster im Genom von *Fno* beschrieben [160]. Dabei handelt es sich um ein Genombereich von etwa 30 kb, der für die intrazelluläre Vermehrung von *Francisella* in Makrophagen und für die vollständige Virulenz in Mäusen essentiell ist (siehe Abb. 3). Die kodierenden Gene werden daher als „intracellular growth locus“ (igl) bzw. „pathogenicity determinant protein“ (pdp) oder veraltet als „pathogenicity island gene“ (pig) bezeichnet [132, 160-163]. Die Genominsel umfasst zwischen 16 bis 19 Open Reading Frames (ORFs) in *Francisella* und wird von transponierbaren Elementen umgeben [160]. Darüber hinaus wird sie durch einen geringen Guanin-Cytosin-Gehalt (G+C-Gehalt) charakterisiert, welcher zwischen 26,6 % und 30,6 % liegt und somit bis zu 6,6 % niedriger ist als der G+C-Gehalt des *Francisella* Genoms (*Fno* 32,48 %) (siehe Abb. 3 [160]). Die FPI wurde in allen bisher sequenzierten *Francisella* Genomen identifiziert [125, 164]. Im Gegensatz dazu konnten in den *Allofrancisella* Spezies FPI-ähnliche Genombereiche nachgewiesen werden [11, 165-167]. In allen *Ft* Subspezies (*Ftt*, *Fth*, *Ft mediasiatica*) ist die FPI in zwei Kopien vorhanden, wohingegen *Fno*, *F. philomiragia* und *F. noatunensis* nur über eine Kopie verfügen [160, 164, 168]. Die FPI verfügt über zwei sich entgegen gerichtete putative Operone. Das Operon *pdpDiglABCD* mit *anmK/pmcA* steht dem Operon mit zwölf ORFs *pdpA*, *pdpB*, *iglE*, *vgrG*, *iglF*, *iglG*, *iglH*, *dotU*, *iglI*, *iglJ*, *pdpC* und *pdpE* gegenüber (siehe Abb. 3, [132, 163]). In *Fth* sind die Gene *anmK* und *pdpD* deletiert, es existieren stattdessen zwei kleine ORFs, die jedoch nicht-funktional sind [132, 162]. Die meisten Genprodukte der FPI besitzen eine unbekannte prognostizierte Lokalisation und keine signifikanten Homologien mit anderen Proteinen oder Proteindomänen, Ausnahmen stellen *anmK*, *iglA*, *iglB*, *dotU*, *vgrG* und *pdpB* dar [125, 132]. AnmK zeigt eine hohe Identität zu Chaperone der Gruppe COG2377 („cluster of orthologous groups“ [COGs], [163]). IglA und IglB (COG3516/17) weisen Strukturhomologien mit der Hülle von Phagenkontraktionsschwänzen [169] und zu Hüllproteinen von Typ-VI-Sekretionssystemen (T6SS) auf [163]. Für die Proteine DotU (COG3523), PdpB (COG3455) und VgrG sind marginale Homologien zu anderen Komponenten des T6SS vorhanden, dabei ähneln DotU und PdpB Proteine des Membrankomplexes und VgrG dem Spikekomplexprotein [125, 132, 170, 171]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wird angenommen, dass die FPI für ein Typ-VI-Sekretionssystem kodiert (siehe unten). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von FPI-Genen und Sekretion von Effektoren unter verschiedenen Umweltbedingungen zunimmt, dazu zählen Eisenmangel, oxidativer Stress und während des intrazellulären Wachstums in

Makrophagen (mit einem Maximum zum Ende des zytosolischen Wachstums [120, 121, 163, 169, 172-175]). Die Stimuli und Mechanismen der Genregulation der FPI-Gene in *Francisella* sind noch nicht genau verstanden [132]. Bisher wurden einige Regulatoren beschrieben, wie z.B. MglA, SspA, FevR, MigR, Hfq und PmrA [132, 176-178]. Durch Deletionsstudien konnten die Gene identifiziert werden, die für die intrazelluläre Replikation in Makrophagen und für eine volle Virulenz in Mäusen erforderlich sind. In *Fno* wurden insgesamt 14 Gene gefunden, die für beides essentiell sind, dazu gehören die Gene *pdpA*, *pdpB*, *iglE*, *vgrG*, *iglF*, *iglG*, *iglH*, *dotU*, *iglI*, *iglJ*, *iglD*, *iglC*, *iglB* und *IglA* [122, 125, 132, 161, 162, 170]. Im Gegensatz dazu sind die Gene *pdpE* und *anmK* weder für die intrazelluläre Replikation noch für die vollständige Virulenz essentiell. Das *pdpC* und *pdpD* Gen sind zwar für die volle Virulenz in Mäusen notwendig, aber nicht für die Replikation in Makrophagen [179]. Die Phagozytose der *Ft* Bakterien durch die Makrophagen erfolgt unabhängig von den FPI-Genen [161, 170, 180]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass beide Kopien der FPI-Gene in *Ftt* und *Fth* für die Virulenz entscheidend sind, da u.a. Tn5-Insertionen oder gezielte Deletionen eines der zwei Kopien die Virulenz von *Francisella* in keiner oder nur in geringer Weise beeinflussen [122, 163].

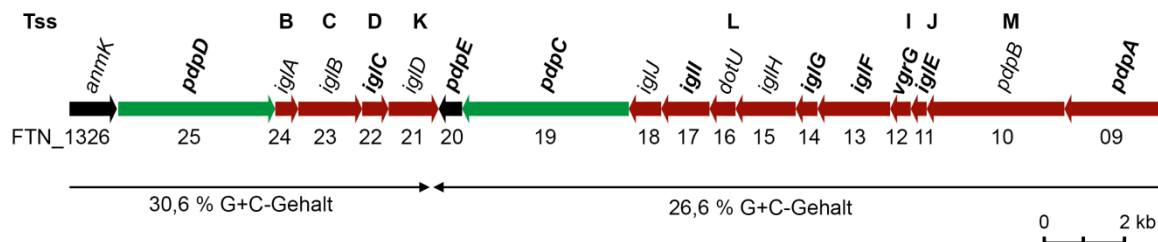


Abb. 3: Schematische Darstellung der FPI in *Fno*. Die Pfeile repräsentieren die ORFs (*FTN_1309* bis *FTN_1326*) der FPI in *Fno* und darüber sind die Gennamen sowie die T6SS Homologe (Tss, Struktur- oder Sequenzhomologe) aufgeführt. In *Ftt* und *Fth* liegt die FPI in zwei Kopien im Genom vor. Die Gene *iglA* bis *pdpA* sind in allen *Francisella* Stämmen vorhanden und stark konserviert, nur die Region *anmK* - *pdpD* weist Unterschiede auf: in *Fth* fehlt sie bzw. es sind nur noch zwei nicht-funktionale verkürzte ORFs vorhanden; im Vergleich zu den ORFs von *Fno* liegen *pdpD* und *anmK* in *Ftt* Stämmen verkürzt vor oder werden durch zwei ORFs kodiert (Bsp. *anmK* in *Ftt* Schu S4). Die roten Pfeile symbolisieren *Fno* Gene, welche für die intrazelluläre Replikation in Makrophagen und für die vollständige Virulenz in Mäusen essentiell sind, die grünen Pfeile repräsentieren *Fno* Gene, die nur für die Replikation in Makrophagen notwendig sind und die schwarzen Pfeile stellen *Fno* Gene dar, die weder für die Replikation noch für die Virulenz erforderlich sind. Die fett schwarz geschriebene Gene wurden als sekretierte, potentielle Effektoren des T6SS identifiziert [169, 170, 181-183]. Oben sind die T6SS Homologe (Struktur- oder Sequenzhomologe) dargestellt. Ebenso ist der G+C-Gehalt der zwei FPI-Bereiche angegeben (*Fno* G+C-Gehalt Gesamtgenom: 32,48 % [160]). Verändert nach Bröms et al. 2010, Clemens et al. 2018 [125, 132].

4.4.1. Typ-VI-Sekretionssystem

Das T6SS bzw. Bestandteile des T6SS wurde erstmals in *Vibrio cholerae* beschrieben [184-186]. Dabei wurde ein Gencluster identifiziert, welches für die Sekretion von Proteinen (Hcp [hemolysin co-regulated protein], VgrG [valin-Glycin-repeat Protein G]) und für die Lyse der Wirtszelle essentiell ist [184]. Ähnliche Gencluster aus 15 bis 25 Genen wurden mittlerweile in mehr als 25 % der gramnegativen Bakterien gefunden, darunter befinden sich viele Pflanzen-, Tier- und Humanpathogene, aber auch symbiontisch lebende Bakterien [187-189]. Kanonische T6SS (z.B. von *V. cholerae*) sind Phagenschwanz-ähnliche Strukturen, die dem Zell-Penetrationsapparat von T4 Bakteriophagen ähnlich sind [125, 132, 190]. Bei einer Kontraktion transportieren sie Makromoleküle (Effektoren) vom Zytosol über die innere und äußere Membran. Diese können entweder in Zielzellen (eukaryotisch oder prokaryotisch) injiziert oder ins extrazelluläre Milieu sekretiert werden und verschiedenste Wirkungen verursachen [125, 187]. Extrazelluläre Bakterien, wie z.B. *V. cholerae*, *P. aeruginosa* oder enteropathogene *Escherichia coli* Stämme, nutzen das T6SS zur Abwehr gegen konkurrierende Bakterien und verfügen teilweise über mehrere T6SS mit unterschiedlichen Funktionen [187-189, 191]. Aus evolutionsbiologischer Sicht sind T6SS mit anderen Kontraktions-Injektions-Systemen (z.B. Myophagen) verwandt, wobei sie stets im Inneren des Bakteriums kontrahieren [192]. Die kanonischen T6SS verfügen über 13 konservierte Zentraluntereinheiten (Core), die als „Type Six Secretion Units“ (TssA bis TssM) bezeichnet werden. Zusammen bilden sie den Membran- und Basalplattenkomplex sowie die kontraktile Hülle, den darin befindlichen Tubulus mit der aufliegenden zentralen Spitze (siehe Abb. 4, [125, 190]). Innerhalb der gramnegativen Bakterien besteht eine große Heterogenität der T6SS-Gencluster [187, 188]. Phylogenetisch betrachtet ist das *Francisella* T6SS mit kanonischen T6SS nicht nah verwandt, jedoch verfügt es über strukturelle Ähnlichkeiten mit dem T6SS von *V. cholerae* [132, 193]. In *Ft* ist das T6SS für das Entkommen aus dem Phagosom, für die intrazytosolische Replikation und für eine vollständige Virulenz in Tieren erforderlich [125, 132, 160].

Membrankomplex. Der Membrankomplex von kanonischen T6SS besteht aus zwei Innenmembranproteinen, TssM und TssL, sowie einem Lipoprotein, TssJ (siehe Abb. 4, [125, 190]). Die TssJLM-Heterodimere bilden einen Kanal, der die Innen- und Außenmembran durchspannt. Trotz begrenzter Sequenzhomologie von *Francisella* Proteinen mit kanonischen Membrankomplex-komponenten konnten für DotU, PdpB und IglE große Struktur- und Funktionshomologien nachgewiesen werden (siehe Abb. 4, [125, 132]). Das Lipoprotein IglE verankert dabei das T6SS in der Außenmembran und interagiert mit dem DotU-PdpB-

Innenmembrankomplex und zusammen bilden sie den Periplasma-durchspannenden Kanal (Abb. 4, [194]).

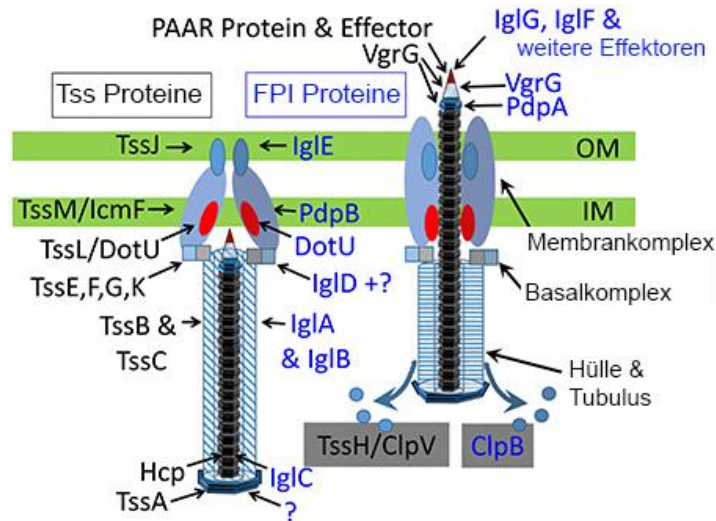


Abb. 4: Darstellung eines kanonischen Typ-VI-Sekretionssystems (T6SS) und des *Francisella* T6SS. Schematische Darstellung eines T6SS in assembliertem (links) bzw. kontrahiertem Zustand (rechts). Das kanonische T6SS (schwarze Schrift) besteht aus einem Membrankomplex (TssJ, TssM, TssL), einem Basalkomplex (TssE, TssF, TssG, TssK), einer Hülle (TssB, TssC), einem Tubulus (Hcp) und einer Spitze (VgrG, PAAR-Protein). TssA und TssH sind mit dem T6SS-assoziiert. Die Tss-Homologen in *Francisella* sind in Blau dargestellt. Bei einer Kontraktion wird der Tubulus mit der darauf sitzenden Spitze durch die Membran gestoßen und die Effektoren abgegeben. Der genaue Aufbau und die Funktionsweise sind für *Francisella* noch nicht beschrieben. Für Details siehe Text. Verändert nach Clemens et al. 2018 [125].

Basalplattenkomplex. In kanonischen T6SS besteht der Basalplattenkomplex aus den Proteinen TssK, TssE, TssF sowie TssG und dient prinzipiell zur Verankerung der Hülle mit dem Membrankomplex und als Plattform für die Zusammenlagerung des Tubulus und der Hülle (siehe Abb. 4, [125, 190]). TssK fungiert als Bindeglied indem es einerseits mit den Membrankomplexkomponenten (TssL, TssM) und andererseits mit den weiteren Basalplattenproteinen interagiert [195, 196]. Die Verbindung zwischen der T6SS Hülle, Tubulus und Spitze mit dem Basalplattenkomplex stellen die Proteine TssE, TssG und TssF her. In *Francisella* sind die am Basalplattenkomplex beteiligten Proteine noch nicht identifiziert. Es wird angenommen, dass IglD Bestandteil des Komplexes ist und die strukturelle Aufgabe von TssK übernimmt (trotz geringer Sequenzhomologie, siehe Abb. 4, [125, 132]). Die homologen Proteine von TssE, TssF und TssG sind in *Ft* noch nicht bekannt [125].

Hülle. In kanonischen T6SS bilden TssB-TssC Heterodimere eine lange kontraktile Hülle in Form eines helikalen Zylinders (siehe Abb. 4 [125, 190]). Bei einer Kontraktion der Hülle werden der innenliegende Tubulus und die darauf sitzende Spitze durch die Membranen bewegt. In *Francisella* besitzen IglA und IglB zwar nur geringe Sequenzhomologien mit TssB

und TssC, jedoch weisen sie strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten auf [169]. Der Aufbau der T6SS Hülle ist in *Fno* gut beschrieben (siehe Abb. 4). Hier besteht sie aus sechs IglA-IglB-Heterodimerscheiben, die eine ähnliche Anordnung mit helikaler Steigung und Drehung zeigen, wie sie bereits für das T6SS von *V. cholerae* beschrieben ist (siehe Abb. 4, [169, 193]). Ebenso ist die Interaktion von IglA und IglB essentiell für die T6SS-Sekretion von Effektoren in *Francisella* [169, 197].

Tubulus. Der Tubulus von kanonischen T6SS wird aus gestapelten Hcp (TssD) Hexamer-Ringen gebildet und stellt das Gerüst für die T6SS-Hülle dar (siehe Abb. 4, [125, 190]). In *P. aeruginosa* sind Hcp-assoziierte Effektorproteine beschrieben, diese können an einem Hcp-Hexamer-Ring im Inneren des Tubulus binden [198]. Das IglC von *Francisella* verfügt zwar über keine Sequenzhomologie mit TssD (Hcp) von kanonischen T6SS, jedoch konnte eine Strukturhomologie nachgewiesen werden [194]. Daher wird angenommen, dass das IglC Protein den inneren Tubulus der kontraktilen Hülle im *Francisella* T6SS bildet (siehe Abb. 4, [169, 194]) und eine Pore in die Wirtszellenmembran formt.

Zentrale Spitze. In kanonischen T6SS wird die zentrale Spitze aus einem VgrG-Trimer gebildet (siehe Abb. 4.). Sie sitzt am Tubulusende und dient der Punktation der eukaryotischer und/oder prokaryotischer Membran [125, 190, 199]. Das VgrG1 von *V. cholerae* besitzt eine „Actin Cross-Linking Domäne“, an der Effektoren binden können [199]. In anderen T6SS kann zusätzlich ein PAAR-Protein binden, wodurch verschiedene Effektormoleküle rekrutiert werden können (siehe Abb. 4, [200]). Das *Francisella* VgrG Protein verfügt nur über geringe Sequenzhomologien und ist deutlich verkürzt im Vergleich zu kanonischen VgrG Proteinen [170]. Es wird vermutet, dass PdpA teilweise die strukturellen und funktionellen Aufgaben der fehlenden kanonischen VgrG-Domänen übernimmt (siehe Abb. 4, [182]). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein VgrG-Trimer an der Spitze des T6SS in *Francisella* sitzt [171]. Darüber hinaus scheint IglG als PAAR-ähnliches Protein zu fungieren, indem es weitere putative Effektoren (z.B. IglF) an das T6SS bindet (siehe Abb. 4, [183]).

Mögliche Effektorproteine. Generell sind die sekretierten Effektorproteine abhängig von der Zielfunktion und -zelle (eukaryotisch oder prokaryotisch) [201, 202]. Häufig vorzufindende anti-eukaryotisch wirkende Effektoren sind z.B. Zytoskelett-Toxine oder Effektoren, die die Phagozytose hemmen. Im Falle von anti-prokaryotische Effektoren werden z.B. Peptidoglycan-Hydrolysasen oder Nukleasen eingesetzt. Für *Francisella* sind die Effektoren noch nicht genau bestimmt, jedoch wurden einige potentielle Effektoren identifiziert, wobei über deren tatsächliche Sekretion kontrovers diskutiert wird. In *Fno* U112 konnte die Sekretion von einigen T6SS-Proteinen während der intrazellulären Replikation in

Makrophagen und im Kulturmedium nachgewiesen werden, dazu gehören IglC, IglE, IglF, IglG, IglI, PdpA, PdpC, PdpD, PdpE und VgrG (siehe Abb. 3, [169, 181-183] [170]). Die Sekretion von vielen dieser putativen Effektoren war abhängig von anderen FPI-Genen (*dotU*, *vgrG*, *iglC*, *iglG* und *pdpA*, [169, 181-183]). Generell scheint die Sekretion der T6SS-Proteine zwischen den *Francisella* Spezies zu variieren. Für *Fth* LVS wurde bisher die Sekretion von IglC, IglE, IglF, IglI, IglJ, PdpE und VgrG nachgewiesen [181]. Darüber hinaus wurden auch sekretierte Effektoren identifiziert, die nicht auf der FPI kodiert sind (z.B. OpiA, OpiB [182]).

Assemblierung und Recycling. Die Assemblierung von kanonischen T6SS ist in enteropathogenen *E. coli* Stämmen gut beschrieben und beginnt mit der Formation des Membrankomplexes [195, 203]. Anschließend erfolgt der Aufbau des Basalplattenkomplexes und der Rekrutierung von VgrG und ggfs. eines PAAR-Proteins [195, 196, 200, 204]. Die Hcp Hexamer-Ringe lagern sich zusammen und formen den Tubulus. Die TssB-TssC Heterodimere bilden die Hülle und verpacken den Tubulus. Nun können die Effektoren an die VgrG-Spitze und den Hcp-Tubulus binden und bei einer Kontraktion des T6SS an die Zielzelle abgegeben werden [125, 198]. Für das T6SS in *V. cholerae* ist eine dynamische Assemblierung, Kontraktion und Disassemblierung beschrieben. Für den Abbau und das Recyceln der T6SS-Hülle ist eine ATPase (ClpV) verantwortlich [124, 132, 205]. Trotz geringer Sequenzhomologie zu TssK, VgrG, Hcp, PAAR-Protein, bzw. des Fehlens einiger T6SS Komponenten in *Francisella* (TssE, TssF, TssG, TssA), wird davon ausgegangen, dass die Assemblierung in einer gleichen oder zumindest ähnlichen Weise erfolgt [124, 125]. In *Fno* konnte ein dynamischer Assemblierungs-Kontraktions-Abbau-Prozess des T6SS veranschaulicht werden [124]. Das T6SS assembliert fast ausschließlich an den Zellpolen und durchspannt dabei die gesamte Länge der Bakterienzelle. Bei der Kontraktion wird die T6SS-Hülle etwa auf die Hälfte ihrer Größe reduziert und der Tubulus wird nach außen durch die Membran gestoßen. Anschließend erfolgen der Abbau und das Recycling der Hülle. Außerhalb der FPI wurde eine ATPase ClpB (ClpV-Homolog) identifiziert, die am T6SS-Recycling-Prozess beteiligt ist [124]. Der dynamische Prozess konnte bei extrazelluläre und intrazelluläre *Fno* verfolgt werden.

4.5. Weitere Virulenzfaktoren

Für *Francisella* sind viele weitere Faktoren beschrieben, die eine Assoziation mit der Virulenz aufweisen. Neben den Genen des T6SS verfügt *Francisella* über TolC Homologe, die ein Typ-I-Sekretionssystem bilden könnten (siehe Abb. 2, [100]). Das Außenmembranprotein TolC wurde als essentiell für die *Fth* LVS Virulenz identifiziert [206].

Darüber hinaus gibt es mindestens zehn weitere Außenmembranproteine, die einen Einfluss auf die *Francisella* Virulenz besitzen, dazu zählen beispielsweise DipA und FopA [207]. Im periplasmatischen Raum und in der Innenmembran sind weitere Virulenz-assoziierte Proteine zu finden, die freie Radikale unschädlich machen, wie z.B. SodC und RipA und Bestandteil eines Zwei-Komponentensystems sein können (z.B. KdpD-KdpE, siehe Abb. 2, [179, 208-210]).

5. Isolat *Francisella* sp. W12-1067

Im Jahr 2012 traten in Heilbronn (Deutschland) vermehrt Fälle der Legionärskrankheit auf, woraufhin potentielle Kontaminationsquellen, wie u.a. Wasserreservoirs (insbesondere Kühltürme), auf das Vorhandensein von *Legionella* Erregern durch das Deutsche Konsiliarlabor für *Legionella* überprüft wurden (Dr. Lück, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, TU Dresden). Aus einer Probe wurde der Stamm W12-1067 isoliert [165]. Weitere Analysen offenbarten, dass es sich dabei um ein *Francisella* Isolat handelte, welches nicht zu der bisher ausschließlich in Deutschland gefundenen Subspezies *Fth* gehörte. Der W12-1067 Stamm (F-W12) ist wie die anderen *Francisella* Vertreter pleomorph und unbegeißelt. Er toleriert Kulturbedingungen zwischen 25 °C und 37 °C, wobei 30 °C und 37 °C optimale Bedingungen darstellen. Der F-W12 Stamm infiziert *in vitro* Makrophagen. Ob das Bakterium im Phagosom der Wirtzelle verbleibt oder ins Zytosol entkommt, war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt. Mithilfe der Gesamtgenomsequenzierung wurde ein Entwurfsgenom des F-W12 Stammes generiert und die weiterführende Analyse *Francisella* spezifischer Gene (*fopA*, *gyrA*, *rpoA*, *groEL*, *sdhA*, *dnaK*) zeigte, dass die DNA-Sequenzidentität von F-W12 zu *Francisella* zwischen 80 - 81 % liegt. Eine größere Identität von 86 % besteht zu einem Umweltstamm aus China, welches ebenfalls aus einem Kühlturm isoliert wurde und mittlerweile als *Allofrancisella guangzhouensis* klassifiziert wird [11]. Da einerseits das Isolat W12-1067 dennoch einen Sequenzunterschied zu *A. guangzhouensis* aufweist und andererseits die Gründung des neuen Genus *Allofrancisella* nicht gesichert ist, wird in dieser Arbeit das Isolat weiter als *Francisella* sp. Isolat F-W12 bezeichnet. Das annotierte Entwurfsgenom des F-W12 verfügt über insgesamt 73 „Contigs“ mit 1541 Protein-kodierenden Gene („Protein encoding genes“ [peg.]) und besitzt eine Größe von etwa 1.704.745 bp [165]. Der G+C-Gehalt des Genoms liegt bei 32,2 % und ähnelt somit dem G+C-Gehalt anderer *Francisella* (*Fno* 32,48 %, [160]). Die charakteristische FPI wurde im Genom des F-W12 Stammes nicht gefunden, jedoch verfügt der Stamm über zwei FPI-ähnliche Genominseln (siehe unten, [165]). Weitere putative Virulenzgene wurden *in silico* identifiziert, dazu zählen u.a. Kapselgene, Chitinasen

und Antibiotikaresistenzgene. Die putativen Chitinasen *peg.490*, *1009*, *1744* und die Kapselgene (*peg.74 - 76*) verfügen über Homologe in *Fno*. Die Struktur des LPS ist noch völlig unbekannt. *In silico* wurden putative Gene gefunden, die an der Struktur des LPS beteiligt sein könnten und Homologe in *Fno* und *F. philomiragia* besitzen (z.B. *peg.634 - 646*). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass F-W12 keine Kapsel bei der Kultivierung in Medium T ausbildet. Da Chitinase-Aktivität im Überstand von F-W12-Kulturen festzustellen war, ist davon auszugehen, dass der Stamm über (mindestens) ein Sekretionssystem verfügt.

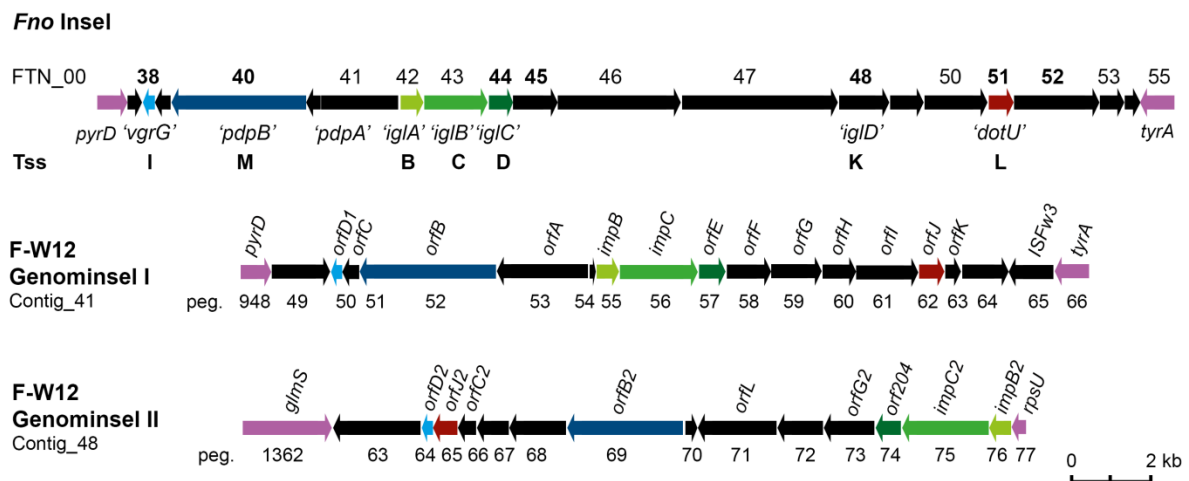


Abb. 5: Schematische Darstellung der FPI-ähnlichen Genominseln in *Fno* und F-W12. Von *Fno* U112 sind die ORFs *FTN_0036* bis *FTN_0055* und von F-W12 die *peg.948* bis *peg.966* (Contig_41, Genominsel I) sowie *peg.1362* bis *peg.1677* (Contig_48, Genominsel II) abgebildet. Die *Fno* Insel und die F-W12 Genominsel I sind zwischen den Genen *pyrD* und *tyrA* integriert, wobei die F-W12 Genominsel II von den Genen *glmS* und *rpsU* flankiert wird. Die ORFs werden durch Pfeile dargestellt, die Gennamen stehen über bzw. unter den Pfeilen. Die FTN- und peg.-Nummern sind mit angegeben sowie die Homologen T6SS-Komponenten (Tss) und die entsprechenden Homologe in *Francisella* in Anführungsstriche aufgeführt. Die fett geschriebenen FTN-Nummern wurden als relevant für die intrazelluläre Replikation in *Drosophila* oder Mäusen identifiziert [211-213]. ORFs mit der gleichen Farbe symbolisieren Proteine mit Sequenzidentitäten, mit der Ausnahme der Farbe Rosa, diese zeigt konservierte Core-Genomgene an. Verändert nach Larsson et al. 2009, Rydzewski et al. 2014, Rigard et al. 2016 [164, 165, 183].

Die oben erwähnten Genominseln im F-W12 weisen putative Genprodukte mit Ähnlichkeiten zum T6SS auf und könnten daher für ein alternatives T6SS kodieren. Besonders groß sind die Identitäten zu einer Genominsel in *Fno*, die der eigentlichen FPI ähnelt, jedoch noch nicht gut verstanden ist [164, 183]. Diese umfasst die ORFs *FTN_0037* bis *FTN_0054* und speziell die Proteine *FTN_0042* und *FTN_0043* besitzen große Proteinsequenzhomologien zu *IglA* bzw. *IglB* (siehe Abb. 5, [164, 165, 183]). Darüber hinaus wurden einige dieser Gene bei Virulenz-Screenings in Mäusen und Insekten identifiziert. Diese beinhalten *FTN_0038*, *40*, *44*, *45*, *48*, *51* und *52*) [211-213]. Die F-W12 Insel I liegt auf dem Contig_41 und umfasst 15 putative ORFs (*peg.950 - 964*) [165]. Darunter sind putative Proteine mit Ähnlichkeiten u.a. zu *VgrG*

(Peg.950), TssM (Peg.952), TssB (Peg.955), TssC (Peg.956), TssD (Peg.957) und TssL (Peg.962) zu finden. Auf dem Contig_48 wurde die putative F-W12 Insel II mit 14 ORFs (*peg.1363* bis *peg.1376*) identifiziert. Auch hier sind putative Homologe u.a. zu VgrG (Peg.1365), TssC (Peg.1375) und TssB (Peg.1376) zu finden. Des Weiteren wurde *in silico* ein Homolog zu IglD/TssK auf dem Contig_71 (Peg.1538) sowie putative T6SS-Regulatoren (wie z.B. MglA [Peg.693]) in F-W12 gefunden.

Nichtsdestotrotz ist noch relativ wenig über den F-W12 Stamm bekannt und eine weiterführende Charakterisierung ist zur Pathogenitätseinschätzung erforderlich.

6. Zielsetzung

Über das vor kurzem entdeckte aquatische *Francisella* Umweltisolat F-W12 ist noch wenig bekannt, insbesondere gibt es kaum Daten bezüglich des vom F-W12 ausgehenden Pathogenitätspotentials für den Menschen. Daher war ein zentrales Ziel dieser Arbeit das F-W12 Isolat weitergehend zu charakterisieren. Dabei sollte einerseits nach einer potentiellen Wirtszelle für F-W12 gesucht werden und andererseits sollten mögliche Virulenzfaktoren experimentell identifiziert werden. Dazu galt es ein Testverfahren für *Francisella* zu adaptieren, welches es ermöglicht mithilfe von Amöben in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl von Klonen einer Tn-Mutantenbank gleichzeitig zu testen.

Ein Hauptvirulenzfaktor von *Francisella* ist ein auf der FPI lokalisiertes T6SS, welches für die intrazelluläre Replikation essentiell ist. Der F-W12 Stamm verfügt nicht über die FPI, jedoch konnten zwei FPI-ähnliche Genominseln identifiziert werden. Um zu untersuchen, ob diese Inseln für ein alternatives T6SS kodieren könnten, sollten die F-W12 Homologen zu IglC und VgrG näher analysiert werden.

Für das weitere Verständnis der *Francisella* Pathogenität sollte ein neues *ex vivo* Lungeninfektionsmodell für *Francisella* etabliert werden, welches die pulmonale Form der Tularämie fokussiert und die Analyse in einem komplexen dreidimensionalen System mit verschiedenen Zelltypen ermöglicht.

Die Tularämie stellt zwar eine seltene Krankheit dar, dennoch ist für die letzten Jahre ein Anstieg der jährlichen Tularämie-Fälle in Deutschland zu verzeichnen. Eine Charakterisierung neuer *Fth* Isolate ist von zentraler Bedeutung, um das Vorkommen von *Francisella* in der Umwelt besser verstehen zu können. Insbesondere zur Analyse der Stammmielfalt und der möglichen Virulenzunterschiede einzelner Subkladen sollten im Rahmen dieser Arbeit die Genome der neuen *Fth* Isolate molekularepidemiologisch analysiert werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Bakterienstämme

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
<i>Francisella</i> sp. Isolat W12-1067 (F-W12)	Umweltisolat	[165]
F-W12 FIV1-Val	F-W12 mit Integrationsvektor FIV1-Val (tRNA ^{Val}), Cm ^R	[214], diese Arbeit
F-W12 FIV2-Val	F-W12 mit Integrationsvektor FIV2-Val (tRNA ^{Val}), Cm ^R	[214], diese Arbeit
F-W12 $\Delta impB$ -orfE	Deletionsmutante der Gene <i>impB</i> („iglA“), <i>impC</i> („iglB“) und <i>orfE</i> („iglC“), Km ^R , Klon 53	diese Arbeit
F-W12 $\Delta impB$ -orfE FIV2- <i>impB</i> -orfE	Komplementation der Deletionsmutante mit <i>impB</i> („iglA“), <i>impC</i> („iglB“) und <i>orfE</i> („iglC“) mittels pFIV2-Val, Km ^R , Cm ^R , Klon 2	diese Arbeit
F-W12 $\Delta impB$ -orfE FIV2-orfD1 Myc	Deletionsmutante mit OrfD1 („VgrG“) Myc tag Fusionsprotein mittels pFIV2-Val, Km ^R , Cm ^R , Klon 1	diese Arbeit
F-W12 $\Delta impB2C2$	Deletionsmutante der Gene <i>impB2</i> und <i>impC2</i> , Hyg ^R , Klon 2	diese Arbeit
F-W12 $\Delta impB2C2$ FIV2-orfD1 Myc	Deletionsmutante mit OrfD1 („VgrG“) Myc tag Fusionsprotein mittels FIV2-Val, Cm ^R , Klon 1	diese Arbeit
F-W12 $\Delta impB$ -orfE $\Delta impB2C2$	Doppeldeletionsmutante der Gene <i>impB</i> , <i>impC</i> , <i>orfE</i> , <i>impB2</i> und <i>impC2</i> , Km ^R , Hyg ^R , Klon 1	diese Arbeit
F-W12 $\Delta impB$ -orfE $\Delta impB2C2$ FIV2- <i>impB</i> -orfE	Komplementation der Doppeldeletionsmutante mit <i>impB</i> , <i>impC</i> und <i>orfE</i> mittels pFIV2-Val, Km ^R , Cm ^R , Klon 2	diese Arbeit
F-W12 $\Delta impB$ -orfE $\Delta impB2C2$ FIV2-orfD1 Myc	Komplementation der Doppeldeletionsmutante mit OrfD1 („VgrG“) Myc tag Fusionsprotein mittels pFIV2-Val, Km ^R , Cm ^R , Klon 2	diese Arbeit
F-W12 $\Delta orfD1$	<i>orfD1</i> („vgrG“) -Deletionsmutante, Km ^R , Klon 1	diese Arbeit
F-W12 $\Delta orfD1$ FIV2-orfD1 Myc	Komplementation der Deletionsmutante mit <i>orfD1</i> („vgrG“) - Myc mittels pFIV2-Val, Cm ^R , Klon 1	diese Arbeit
F-W12 Scatterklone 1 - 79	amöbensensitive F-W12 Klone mit	[85],

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
Sc#50	integriertem Tn5 Transposon, Km ^R Scatterklon #50, <i>glk::Tn5</i> , Km ^R	diese Arbeit [215], diese Arbeit
Sc#50 FIV2- <i>glk</i>	Komplementation des Sc#50 (<i>glk::Tn5</i>) mit <i>glk</i> mittels pFIV2-Val, Km ^R , Cm ^R , Klon 2	[216]*, diese Arbeit
F-W12 ΔMyo	Deletionsmutante der Gene des putativen Myo-Inositol-Stoffwechsels (<i>peg.278 - 284</i>), Km ^R , Klon A	[216]*, diese Arbeit
F-W12 ΔMyo FIV2-Myo	Komplementation der Deletionsmutante mit <i>peg.278 - 284</i> mittels pFIV2-Val, Km ^R , Cm ^R , Klon 1	[216]*, diese Arbeit
<i>Francisella tularensis holarctica</i> (Fth) „Live Vaccine Strain“ (LVS)	Impfstamm	ATCC 29684
Fth LVS Δ <i>iglC</i>	Deletionsmutante beider <i>iglC</i> -Kopien	[122]
Fth LVS Δ <i>iglC</i> FIV2- <i>iglC</i> Fth	Komplementation der Deletionsmutante mit <i>iglC</i> mittels pFIV2-Val, Cm ^R , Klon 1	[214]
Fth LVS Δ <i>iglC</i> FIV2- <i>impB-orfE</i>	Transformation der Deletionsmutante mit <i>impB</i> („ <i>igIA</i> “), <i>impC</i> („ <i>igIB</i> “) und <i>orfE</i> („ <i>igIC</i> “) von F-W12 mittels pFIV2-Val, Cm ^R , Klon 1	diese Arbeit
Fth LVS Δ <i>vgrG</i>	Deletionsmutante beider <i>vgrG</i> -Kopien	[171]
Fth LVS Δ <i>vgrG</i> FIV2- <i>orfD1</i> Myc	<i>trans</i> -Komplementation der Deletionsmutante mit OrfD1 („VgrG“ von F-W12) Myc-tag Fusionsprotein mittels pFIV2-Val, Cm ^R , Klon 1 und 2	diese Arbeit
Fth LVS pMP814- <i>gfp</i>	Impfstamm mit pMP814-kodiertem GFP	diese Arbeit
Fth A660	Patientenisolat aus Fth Stammsammlung	[217], diese Arbeit
<i>Francisella novicida</i> (Fno) U112	Wildtyp	ATCC 15482
Fno U112 Δ <i>iglC</i>	<i>iglC</i> -Deletionsmutante, Km ^R	[161]
Fno U112 Δ <i>iglC</i> FIV2- <i>impB-orfE</i>	<i>trans</i> -Komplementation der Deletionsmutante mit <i>impB</i> („ <i>igIA</i> “), <i>impC</i> („ <i>igIB</i> “) und <i>orfE</i> („ <i>igIC</i> “) von F-W12 mittels pFIV2-Val, Cm ^R , Klon 2	diese Arbeit
Fno Fx1	Wildtyp	FSC 156
<i>E. coli</i> DH5α	F-, Ω80 <i>lacZ</i> Δ15, Δ(<i>argF lac</i>), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (rk-, mk-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA69</i> , <i>relA1</i> λ-	[218]
<i>E. coli</i> OneShot Top10 cells	F-, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>araleu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

* in Revision

1.2. Genome

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendeten Genome.

Bakterienstamm	GenBank-Nummer / BioProject ID
<i>Fth</i> LVS	NC_007880.1
<i>Fno</i> U112	NC_008601
F-W12	AWHF01000000
<i>Fth</i> OSU18	NC_017463.1
<i>Fth</i> FSC162	PRJNA89145
<i>Fth</i> FSC200	NC_019551.1
FTNF002-00	NC_009749.1
FDC407/ FDC408/ FDC409	PRJNA285142
<i>Fth</i> -41 / <i>Fth</i> -Most	PRJEB33006
<i>A. guangzhouensis</i>	CP010427
<i>F. halitica</i>	CP022132
<i>F. philomiragia</i> ATCC 25015	NZ_DS999311
<i>Fno</i> Fx1	CP002557
<i>F. hispaniensis</i> 3523	CP002558
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GCA_000146045.2
<i>Vitis vinifera</i>	GCA_000003745.2
<i>Homo sapiens</i>	GRCh38
<i>Mus musculus</i>	GCA_000001635.7

1.3. Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tab. 3 aufgelistet und im Anhang sind die dazugehörigen Vektorkarten zu finden.

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Vektor	Charakteristika	Referenz
pGEM-T Easy	TA-Klonierungsvektor, Amp ^R , <i>lacZ</i> -Gen, T7-Promotor, 3015 bp	Promega
pFIV1-Val	<i>Francisella</i> -Integrationsvektor, Cm ^R , <i>Ft</i> Promotor GroES (pGroES), pGroES-W12, PRE, <i>attL</i> -site (tRNA), <i>attB</i> (chromosomal) <i>attP</i> (episomal), pMB1 ori, 7706 bp	[214]
pFIV2-Val	<i>Francisella</i> -Integrationsvektor, Cm ^R , pGroES, pGroES-W12, PRE, <i>attL</i> -site (tRNA), <i>attB</i> (chromosomal) <i>attP</i> (episomal), <i>attR</i> - site, <i>SacB</i> , pMB1 ori, 9014 bp	[214]

1.4. Plasmide

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Plasmide.

Bezeichnung	Vektor	Charakteristika	Referenz
pImpB-orfE::km	pUC57	1300 bp upstream-Sequenz von <i>impB</i> , Km ^R Gen, Promotor pGroES, 1371 bp downstream Sequenz von <i>orfE</i> , Größe des Inserts: 4039 bp, Amp ^R	diese Arbeit*
pImpB2C2::hyg	pUC57	1184 bp upstream-Sequenz von <i>impB2</i> , Hyg ^R Gen, Promotor pGroES, 1156 bp downstream Sequenz von <i>impC2</i> , Größe des Inserts: 3771 bp, Amp ^R	diese Arbeit*
pOrfD1::km	pUC57	1200 bp upstream-Sequenz von <i>orfD1</i> („ <i>vgrG</i> “), Km ^R Gen, Promotor pGroES, 1200 bp downstream Sequenz von <i>orfD1</i> , Größe des Inserts: 3688 bp, Amp ^R	diese Arbeit*
pPeg.278-284::km	pUC57	1097 bp upstream-Sequenz von <i>peg.278</i> (UxuB), Km ^R Gen, Promotor pGroES, 1101 bp downstream Sequenz von <i>peg.284</i> (MIOX), Größe des Inserts: 3474 bp, Amp ^R	diese Arbeit*
pPeg.278-284 komp	pGEM-T Easy	PCR-amplifiziertes Fragment von <i>peg.278</i> (UxuB) bis <i>peg.284</i> (MIOX), Größe des Inserts: 8417 bp, Amp ^R	diese Arbeit [216] ^o
pFIV2-Myo	pFIV2-Val	Insert aus pPeg.278-284 komp, mit NotI kloniert, Cm ^R	diese Arbeit [216] ^o
pImpB-orfE komp	pUC57	<i>impB</i> („ <i>iglA</i> “), <i>impC</i> („ <i>iglB</i> “) und <i>orfE</i> („ <i>iglC</i> “) Gene aus F-W12 (3154 bp), Amp ^R	diese Arbeit*
pFIV2-impB-orfE	pFIV2-Val	<i>impB</i> („ <i>iglA</i> “), <i>impC</i> („ <i>iglB</i> “) und <i>orfE</i> („ <i>iglC</i> “) Gene aus pImpB-orfE komp, mit NcoI/NotI kloniert, Cm ^R	diese Arbeit
pOrfD1 komp	pUC57	<i>orfD1</i> („ <i>vgrG</i> “) Gen aus F-W12 mit Myc tag (364 bp), Amp ^R	diese Arbeit*
pFIV2-orfD1	pFIV2-Val	<i>orfD1</i> („ <i>vgrG</i> “) Gen aus pOrfD1 komp, mit KpnI/NotI kloniert, Cm ^R	diese Arbeit
pOrfD1 Myc	pUC57	<i>orfD1</i> („ <i>vgrG</i> “) Gen aus F-W12 mit Myc tag (364 bp), Amp ^R	diese Arbeit*
pFIV2-orfD1-Myc	pFIV2-Val	<i>orfD1</i> („ <i>vgrG</i> “) Gen aus pOrfD1 Myc, mit KpnI/NotI kloniert, Cm ^R	diese Arbeit
pGlk komp	pGEM-T Easy	PCR-amplifiziertes Fragment von <i>glk</i> , Größe des Inserts: 1488 bp, Amp ^R	diese Arbeit [216] ^o
pFIV2-glK	pFIV2-Val	Insert aus pGlk komp, mit NotI kloniert, Cm ^R	diese Arbeit [216] ^o

* Plasmide wurden von der Firma GeneCust bereitgestellt; ^o in Revision

1.5. Oligonukleotide

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Referenz
FhPhage1 (Fha-1)	aatcactccaatagccagtactaagga	61,9	[219, 220]
FhPhage3*	ctgagaattaagccacttatatcagaat	59,3	[219, 220]
FhPhage4* (Fha-4*)	gtaaaacccgttggtcaaccttatcag	63,4	[220]
<i>galU</i> komp F	gatatcaccgttcattgtgacgtt	59,3	diese Arbeit ⁱ
<i>galU</i> komp R	tacgatcggctgttttagacca	58,4	diese Arbeit ⁱ
GroES F	ccaaacatcgcaaaagggtgtaa	57,1	diese Arbeit
Hyg_F	gaacagcttgatcaccgggtc	61,8	diese Arbeit
Hyg_R	accaacatcttcgtggacct	57,3	diese Arbeit
<i>impB1_F</i>	tcacatggacggaacaatagac	58,4	diese Arbeit
<i>impB2_F</i>	tgaaaacctgttgaaacctgcta	57,1	diese Arbeit
<i>impC2_R</i>	agaattaggatttggtgctgtgg	58,9	diese Arbeit
KAN-2 FP-1	acctacaacaaagctctcatcaacc	61,3	Epicentre
KAN-2 RP-1	gcaatgtaacatcagagatttgag	58,1	Epicentre
Km_Seq_1U	gcatcgcttctatcgctt	59,4	diese Arbeit
Km_Seq_F	ctcttcagcaatatcacgggtag	60,6	diese Arbeit
M_ <i>impB</i> _test_R	gtacgacaatctcagcggatatct	60,6	diese Arbeit
M_ <i>impB</i> _test_U	gaacatggaagcgagctagaatt	58,9	diese Arbeit
M_ <i>impB2_F</i>	acttcgtccatacaactagtcaga	59,3	diese Arbeit
M_ <i>impB2_F</i> #	gccgctatcctactaaagtaa	55,9	diese Arbeit
M_ <i>impB2_F</i> *	tcattctccatacttatagccgct	58,9	diese Arbeit
M_ <i>impB2_R</i>	cgctcatacgggttaatatctct	58,9	diese Arbeit
M_ <i>impB2_R</i> #	attgcattccacctatctccat	56,5	diese Arbeit
M_ <i>impB2_R</i> *	tattcttaattcagaaggcgcg	58,9	diese Arbeit
M_ <i>peg.278_F</i>	gctgcttgctctaaacaatgaa	57,1	diese Arbeit ⁱ
M_ <i>peg.278_R</i>	aaaggctatcgacagggtataa	58,9	diese Arbeit ⁱ
M_ <i>vgrG1_F</i>	actctgatgacaaaagtgtgct	57,1	diese Arbeit
M_ <i>vgrG1_R</i>	cgacttattgtacggcttaggta	58,9	diese Arbeit
M13R	ggaaacagctatgacctg	54,4	[221]

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Tm (°C)	Referenz
M13U	gtaaaacgacgccagt	52,8	[221]
Myo komp F	aaaattaccacagctactttgat	54,2	diese Arbeit ⁱ
Myo komp R	ttgtttatatttcggtcgga	54	diese Arbeit ⁱ
<i>orfE_R</i>	aactccaaactcacaccctagt	58,4	diese Arbeit
<i>orfE_R*</i>	actaggggtgtgagttggagtt	58,4	diese Arbeit
<i>peg.278_F</i>	agtaggttagctggctggatat	58,9	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.278_R</i>	actgtaatacgcctttgagct	57,1	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.279_R</i>	cgtccaatctagaacaggcataa	58,9	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.279_F</i>	agaagtacgtggtgtgcatatg	58,9	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.280_R</i>	aaagtcacgtcacctaaagctg	58,9	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.281_F</i>	agagaccataaccttccttacgt	58,9	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.281_R</i>	cttgagggaacacagcttgtaa	58,9	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.282_F</i>	ctactatactcgtgagctggct	60,6	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.282_F2</i>	caaatcctgagctacatcctgtg	60,6	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.282_R</i>	cagtagggcacgagtatcatcta	60,6	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.283_F</i>	ggctcgtgaaaccttgataaaga	58,9	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.283_F2</i>	gctcctaatacggggttagt	60,6	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.284_R</i>	tggatcactctcatcatggacat	58,9	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.284_R2</i>	tgaactttatcaaaaccacagcct	57,6	diese Arbeit ⁱ
<i>peg.721_F</i>	agctcctatcaatccaacgtct	58,4	diese Arbeit
<i>peg.721_R</i>	acgttgctgagggtttaggt	57,3	diese Arbeit
Phage2**	attagcaatgagtagctgtgtct	58,1	[220]
Phage5	taaatttctctgaggtgccaca	57,1	diese Arbeit
RD1/F	tttatataggtaaatgtttacctgtacca	58,6	[77]
RD1/R	gccgagtttgatgctgaaaa	55,2	[77]
UNFOR403	tgaggacaaatatcattctgagg	57,1	[222]
UNREV1025	gggtgtcctccaattcatgtta	56,5	[222]
<i>vgrG1_R</i>	aacaccactagaagaaagctcca	58,9	diese Arbeit
W12Phage1	cttgcttcaatgactggggtttg	58,9	[214]
W12Phage4	atccaggaatctttgtaggagct	58,9	[214]

ⁱ Chen et al. 2020 (in Revision) [216]

1.6. Enzyme

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller
<i>Hind</i> III-HF	Restriktionsenzym	NEB
<i>Kpn</i> I-HF	Restriktionsenzym	NEB
<i>Nco</i> I-HF	Restriktionsenzym	NEB
<i>Not</i> I-HF	Restriktionsenzym	NEB
T4 DNA-Ligase	DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB)
Top-Taq	DNA-Polymerase	Qiagen GmbH

HF = High-Fidelity

1.7. Antikörper

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Charakteristika	Bezugsquelle	Referenz
α -OrfE	anti-OrfE („IgC“) Primärantikörper aus dem Kaninchen, polyklonal	LifeTein, LLC.	diese Arbeit
α -Myc-tag	anti-c-Myc Primärantikörper (THE™ c-Myc Tag) aus der Maus, monoklonal	GenScript	[223]
α -GFP	anti-GFP Primärantikörper aus dem Kaninchen, polyklonal	ThermoFisher A11122	[214]
α -CD68	anti-CD68 Primärantikörper aus dem Kaninchen, polyklonaler Alveolarmakrophagen-Marker	abcam ab125212	[224]
α -LPS- <i>Fth</i>	anti-LPS (<i>Fth</i>) Primärantikörper aus dem Kaninchen, monoklonal	ZBS2, RKI	[225]
α -Maus IgG-HRP	Sekundärantikörper aus der Ziege, Meerrettich-Peroxidase konjugiert	ThermoFisher 62-6520	
α -Kaninchen IgG-HRP	Sekundärantikörper aus der Ziege, Meerrettich-Peroxidase konjugiert	ThermoFisher 65-6120	

1.8. Humanes Lungengewebe

Die humanen Lungengewebsproben wurden von Bronchialkarzinompatienten, bei denen eine Lungensektion vorgenommen wurde, an verschiedenen Zentren der Charité Berlin gesammelt. Die Studie unterliegt der Ethikkommission der Charité Berlin (Universitätsmedizin Berlin, EA2/079/13) und hat deren Zustimmung. Die volljährigen Patienten wurden an den Chirurgischen Zentren aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Das tumorfreie Lungengewebe wurde an der Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie

und Pneumologie der Charité Berlin (AG Hippenstiel und AG Hocke) in 3×8×8 mm große (80 bis 200 mg) Lungengewebsstücke geschnitten.

1.9. Infektionsmodelle

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendeten Infektionsmodelle.

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
<i>A. lenticulata</i> 45	Amöbenzelllinie	ATCC 50703
<i>A. lenticulata</i> 118	Amöbenzelllinie	ATCC 50706
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2	Laborstamm, axenisch	DBS0235520
U937	humane Makrophagen-ähnliche Zelllinie	ATCC CRL-1593.2
J774 A.1	Mausmakrophagen-ähnliche Zelllinie	ATCC TIB-67
A549	humane Alveolarepithelzell (Typ II) -ähnliche Zelllinie	ATCC CCL-185
HD11	Hühnermakrophagen-ähnliche Zelllinie, transformiert mit Vogel-Myelozytomatose Typ MC29 Virus	[226, 227]
ex vivo Lungenmodell	humanes, tumorfreies Lungengewebe von Lungenkarzinom-Patienten	Charité, Universitätsklinikum Berlin
primäre Alveolarmakrophagen	isolierte Zellen aus humanen Lungengewebe	Charité, Universitätsklinikum Berlin

1.10. Verwendete Kits

Tab. 9: In dieser Arbeit verwendeten Kits.

Bezeichnung	Referenz
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH
EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit	Epicentre
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Strattec Molecular GmbH
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega GmbH
Power Soil DNA Kit	MoBio
Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH

1.11. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen:

Applied Biosystems (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt); Bio Rad (München), Dianova (Hamburg), Eurofins MWF Operon (Ebersberg), Fermentas (ST. Leon-Rot), Gerbu (Gaiberg), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England BioLabs (Frankfurt am Main), Oxoid (Wesel), PAA Laboratories (Cölbe), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Thermo Scientific (Bonn), VMR International (Nürnberg).

1.12. Größenstandards

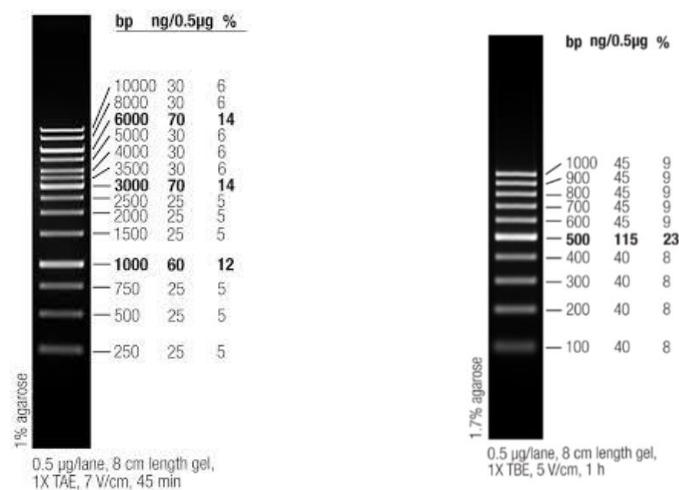


Abb. 6: Größenstandards zur Analyse von DNA-Fragmenten im Agarosegel. links: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; rechts: GeneRuler 100 bp DNA Ladder; beide von ThermoFisher; 10 µl im 1 % (links) bzw. im 1,7 % (rechts) Agarosegel.

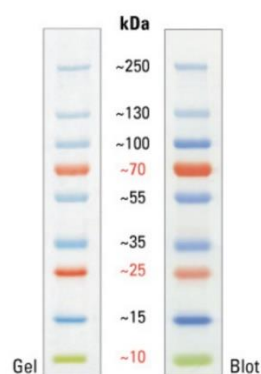


Abb. 7: Proteingrößenstandards zur Analyse von denaturierten Proteinen im SDS-PAGE. (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, ThermoFisher, 3 µl im SDS-Gel)

1.13. Medien, Puffer und Zusätze

1.13.1. Medien

Tab. 10: Wachstumsmedium für *E. coli*.

	LB-Flüssigmedium	LB-Nährböden
Bacto Trypton	10 g	10 g
Hefeextrakt	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Agar	–	12 g
	ad 1000 ml H ₂ O _{dest} und autoklavieren	
LB = Luria-Bertani Medium bzw. "Lysogeny Broth"		

Tab. 11: Wachstumsmedium für *Francisella*.

		Medium T	MTKH
Lösung 1	Brain Heart Infusion Broth	10 g	10 g
	Bacto Trypton	10 g	10 g
	technische Casamino-säuren	10 g	10 g
	Aktivkohle	–	2,5 g
	Agar	–	12 g
	pH 7,15 - 7,25 einstellen, ad 500 ml H ₂ O _{dest} , autoklavieren		
Lösung 2	BBL Hämoglobin, lyophilisiert	–	10 g
	ad 500 ml H ₂ O _{dest} und autoklavieren		
Lösung 3	Magnesiumsulfat	0,05 g	0,05 g
	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	1,37 g	1,37 g
	Kaliumchlorid	0,2 g	0,2 g
	di-Kaliumhydrogenphosphat	0,4 g	0,4 g
	L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	0,6 g	0,6 g
	Glucose	15 g	15 g
	Eisen(II) Sulfat	0,1 g	0,1 g
	ad 50 ml H ₂ O _{dest} und für 30 min bei 100 °C in Dampftruhe		
		Lösung 1 und 3 mischen	Lösung 1, 2 und 3 mischen
MTKH = Medium T supplementiert mit Aktivkohle und Hämoglobin			

Tab. 12: Alternativnährboden für F-W12.

BCYE-Nährböden:	
ACES	10 g
Hefeextrakt	10 g
pH 6,9 einstellen, ad 1000 ml H ₂ O _{dest} , dann Zugabe von:	
Aktivkohle	2 g
Agar	15 g
autoklavieren und Zugabe von sterilfiltriertem:	
0,4 g L-Cystein in 10 ml H ₂ O _{dest}	
Fe ^{III} (NO ₃) ₃ x 9 H ₂ O in 10 ml H ₂ O _{dest}	
BCYE = "Buffered charcoal yeast extract"	

Tab. 13: Chemisch definiertes Medium nach Chamberlain (CDM) für *Francisella*.

CDM:	
Arginin	0,4 g
Asparaginsäure	0,4 g
Glucose	4 g
Histidin	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Lysin	0,4 g
Methionin	0,4 g
MgSO ₄	0,135 g
NaCl	10 g
Prolin	2 g
Serin	0,4 g
Thiamin	0,004 g
Threonin	2 g
Leucin	0,4 g
Isoleucin	0,4 g
Tyrosin	0,4 g
Valin	0,4 g
Calcium Pantothenate	0,002 g
Spermine	0,04 g
pH 6,2 - 6,4, ad 950 ml H ₂ O _{dd} , dann Zugabe von:	
Cystein	0,2 g
FeSO ₄	0,002 g
ad 1 l H ₂ O _{dd} , sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern	

Tab. 14: Wachstumsmedium für *A. lenticulata*.

PYG-Wachstumsmedium:		
Proteose Pepton	20 g	
Hefeextrakt	1 g	
Na ₃ -Citrat × 2 H ₂ O	1 g	
0,4 M MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10 ml	
0,25 M Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O	10 ml	
0,25 M KH ₂ PO ₄	10 ml	
0,05 M CaCl ₂ × 2 H ₂ O	8 ml	
ad 940 ml H ₂ O _{dest} , autoklavieren und danach sterilfiltriert hinzu geben:		
0,005 M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	10 ml	
2 M Glucose	50 ml	
PYG = „Peptone Yeast Glucose“		

Tab. 15: Axenisches Wachstumsmedium für *D. discoideum* AX2.

HL5 Medium:		
Lösung 1	Proteose Pepton	7,15 g
	Hefeextrakt	3,58 g
	Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O	0,64 g
	KH ₂ PO ₄	0,25 g
	pH 6,7 einstellen, ad 450 ml H ₂ O _{dest} und autoklavieren	
Lösung 2	Maltose	9 g
	ad 50 ml H ₂ O _{dest} und sterilfiltrieren	
Lösung 1 und 2 vereinen		

1.13.2. Puffer

Phosphat-gepufferter Salzlösung („Phosphate-buffered saline“, PBS): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄; pH 7,2 einstellen; ad 1 l H₂O_{dest}; autoklavieren

10x Natriumdodecylsulfat-Laufpuffer („Sodium dodecyl sulfate“, SDS): 30 g Tris/HCl; 144,4 g Glycin, 10 g SDS; ad 1 l H₂O_{dest}

50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE): 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA; ad 1 l H₂O_{dest}

10x Tris-gepufferte Salzlösung („Tris-buffered saline“, TBS): 76,5 g NaCl; 54 g HCl; pH 7,6 einstellen; ad 1 l H₂O_{dest}; autoklavieren

Towbinpuffer: 3 g Tris; 14,4 g Glycin; 20% (\triangleq 200 ml) Methanol; ad 1 l H₂O_{dest}

50x Soerensenspuffer (SP): 49,93 g K₂PO₄; 17,88 g Na₂HPO₄; ad 500 ml H₂O_{dest}; autoklavieren

Tab. 16: Zusammensetzung des Infektionspuffers (IP).

Ansatz A		Ansatz B	
Natrium Citrat	1 g	NaCl	5 g
0,4 M MgSO ₄ x7 H ₂ O	10 ml	Glucose	10 g
0,25 M Na ₂ HPO ₄ x7 H ₂ O	10 ml	0,005M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x2H ₂ O	10 ml
0,25 M KH ₂ PO ₄	10 ml	ad 50 ml H ₂ O _{dest} und sterilfiltrieren	
0,05 M CaCl ₂ x2 H ₂ O	8 ml		
ad 950 ml H ₂ O _{dest} und autoklavieren			
Ansatz A und Ansatz B zusammen führen, bei 4 °C lagern			

IP_D (IP für *D. discoideum*): Mischverhältnis von 1:1 von HL5 Medium und 1x SP

1.13.3. Antibiotika und weitere Zusätze

Tab. 17: In dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Zusätze.

Zusatz	Lösungsmittel	Konzentration [µg/ml]			
		Medium (flüssig) <i>Francisella</i> / <i>E. coli</i>		Nährböden <i>Francisella</i> / <i>E. coli</i>	
Ampicillin (Amp)	H ₂ O _{dd}	–	100	–	100
Chloramphenicol (Cm)	Ethanol	8	40	10	40
Kanamycin (Km)	H ₂ O _{dd}	12	40	5	40
Hygromycin (Hyg)	H ₂ O _{dd}	200	–	200	–
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	H ₂ O _{dd}			–	100 mM
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Dimethylformamid			–	2 % (w/v)
Sucrose	H ₂ O _{dd}			–	5 % (w/v)

1.14. Geräte**Tab. 18: Geräteliste.**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	1000 I	Webeco
aCOLyte	Kolonie-Zähler	Synbiosis
Agarosegeldokumentation	Fas Digi Geldokumentationssystem	Nippon Genetics
Bakterienplattierer	Whitley Spiralplater	dw Scientific
Brutschrank (37 °C)	Incudrive S	Heraeus Holding GmbH
Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)	C150	Binder
Eismaschine	AF-80	Scotsman
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl-Zeiss
Feinwaage	PLJ 600-3NM	Kern
FastPrep	FastPrep-24™ Classic Instrument	MP Biomedicals
Gefrierschrank (-20 °C)	Pro Comfort	Privileg
Gefrierschrank (-80 °C)	MDF-U53V	Sanyo
Grobwaage	470	Kern
Heizblock	Bio TDB-100	Biosan
Kühlschrank	Bio	Privileg
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Scientific
Lichtmikroskop	Wilovert 30	Helmut Hund GmbH
Magnetrührer	L-81	Labinco
pH-Meter	FE20-FiveEasy	Mettler Toledo
Photometer	Genesys 10 Bio	Thermo Scientific
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf
Pipettierhilfe	accu-jet pro	Brand
Protein-Elektrophoreseapparatur	Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Schüttelinkubator	TH30	Endmund Bühler GmbH
Schüttelinkubator	Ecotron	Infors HT
Sterilwerkbank	Herasafe KS	Thermo Scientific
Thermoschüttler	Comfort	Eppendorf
Vortex	VTX-3000L	LMS
Zentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf

2. Methoden

2.1. Kultivierungstechniken

2.1.1. Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde auf LB-Nährböden bei 37 °C bzw. in LB-Flüssigmedium bei 37 °C und 250 rpm über Nacht (ÜN) kultiviert. Wenn erforderlich wurden Antibiotika und weitere Zusätze den Medien zugesetzt (siehe Tab. 10).

2.1.2. Kultivierung von *Francisella*

Für die Kultivierung von *Francisella* wurden Medium T und MTKH-Nährböden verwendet [214, 228] siehe Tab. 11). Dabei wurden die Bakterien bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1 bis 3 Tage bzw. ÜN bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. F-W12 konnte ebenso auf BCYE-Nährböden kultiviert werden (siehe Tab. 12). Bei Bedarf wurden die Medien mit Antibiotika und weiteren Zusätzen supplementiert (siehe Tab. 17). In Einzelfällen wurden die kommerziell erhältlichen CHAB- (cysteine-heart-blood-agar, Thermo Fisher) und CHAB-PACCV-Nährböden (CHAB-Nährböden angereichert mit den Polymyxin B, Amphotericin B, Cyclohexamid, Cefepim und Vancomycin entwickelt für die Isolation von *Francisella* aus Umweltproben, [72, 229]) verwendet. Alle Arbeiten mit *Francisella* wurden unter BSL-2 Bedingungen durchgeführt.

2.1.3. Konservierung von Bakterien

Von einer gut bewachsenen Nährbodenplatte (je nach Bakterienstamm zwischen 1 bis 3 d) wurden die Bakterien mithilfe einer Impföse abgenommen und in 20 % Glycerin resuspendiert. Eine langfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.1.4. Kultivierung von *A. lenticulata*

A. lenticulata wurde in 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc EasYFlasks™ #156367, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) in PYG-Medium (siehe Tab. 14) stehend bei Raumtemperatur (RT) kultiviert. Die Amöben wurden wöchentlich 1:20 passagiert. Dabei wurden diese durch Abklopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, resuspendiert und in frisches PYG-Medium überführt.

2.1.5. Kultivierung von *D. discoideum*

D. discoideum Ax2 wurde bei RT und 120 rpm im HL5 Medium (siehe Tab. 15) kultiviert und einmal wöchentlich 1:100 in frischen HL5 Medium passagiert.

2.1.6. Kultivierung von Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien (U937, A549, HD11, J774) wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen in RPMI-1640 (RPMI, mit 2 g/l NaHCO₃, stabilem Glutamin, niedrigen Endotoxin, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und zweimal wöchentlich passagiert, indem sie 1:10 in frisches RPMI supplementiert mit 10 % FCS gegeben wurden. Die adhärenenten Zelllinien J774 bzw. HD11 und A549 wurden mittels eines Zellschaber vom Kulturflaschenboden bzw. durch die Zugabe von Accutase (CORNING) gelöst. Die Suspensionszellen U937 konnten direkt mit der Pipette entnommen werden.

2.2. Zellzahlbestimmung

2.2.1. Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer

Für die Zellzahlbestimmung der J774, A549, HD11 und U937 Zellen wurde die Zählkammer nach Neubauer (C-Chip Neubauer improved DHC N01, DigitalBio) verwendet. Dazu wurde nach Ablösen der Zellen die Zellsuspension 1:1 mit Trypan Blau versetzt (Anfärben der toten Zellen) und nach kurzer Inkubation in die Neubauer-Zählkammer überführt. Der Durchschnittswert von insgesamt 8 Großquadraten wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10⁴) multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter (ZZ/ml) zu erhalten. Für die Zellzahlbestimmung der *A. lenticulata* wurde ebenfalls die Zählkammer nach Neubauer verwendet. Dazu wurden direkt 15 µl aus der Amöbensuspension in die Neubauer Zählkammer überführt und der Durchschnittswert von 8 Großquadraten mit dem Kammerfaktor (10⁴) multipliziert, um die ZZ/ml zu erhalten.

2.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Spiral-Ausplattierer

Zur Bestimmung der Lebenszellzahl einer Bakteriensuspension wurde der Whitley Spiralplater verwendet. Das Gerät plattiert 50 µl einer Suspension spiralförmig mit logarithmisch abnehmender Konzentration auf Nährböden aus. Die Platten wurden inkubiert bis Einzelkolonien sichtbar waren. Die Kolonien wurden mithilfe des Koloniezählers aCOLyte ausgezählt und die Anzahl der kolonieformenden Einheiten („colony forming units“ = CFU) pro Milliliter (CFU/ml) ermittelt.

2.2.3. Photometrische Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung einer Bakteriensuspension wurde mithilfe eines Photometers vorgenommen, wobei die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 1 ml einer Kultur gemessen wurde. Eine OD_{600} von 1 entspricht etwa 1×10^9 Bakterien pro Milliliter.

2.3. DNA-basierte Methoden

2.3.1. Synthetisch hergestellte Konstrukte

Für die Generierung von Deletionsmutanten und deren Komplementationen wurden synthetisch hergestellte Konstrukte verwendet. Dazu wurden die DNA-Sequenzen mithilfe der *in vitro* DNA-Synthese von der Firma GeneCust (Dudelange, Luxemburg) hergestellt und mittels DNA-Sequenzierung überprüft und in den pUC57 kloniert. Die Konstrukte für die Herstellung der Deletionsmutanten (pImpB-orfE::km, pImpB2C2::hyg, pOrfD1::km, pPeg.278-284::km, siehe II.1.4.) verfügten über eine Antibiotikaresistenzkassette (Km^R oder Hyg^R) mit dem *Francisella*-Promotor GroES, welche von flankierenden Genombereichen (jeweils etwa 1 kb) des zu deletierenden Gens umgeben waren. Mithilfe dieser flankierenden DNA-Sequenzen konnte über die homologe Rekombination ein Austausch des zu deletierenden Gens mit der Antibiotikaresistenzkassette im F-W12 erfolgen.

Für die *trans*-Komplementation mit den Genen von F-W12 (*impB-orfE*) bzw. mit den Fusionsproteinen (OrfD1-Myc) wurden ebenfalls von der Firma GeneCust synthetisch hergestellte Konstrukte verwendet. Hierbei wurde die gesamte DNA-Sequenz des Gens sowie 300 bp upstream und 60 bp downstream vom Gen verwendet, welche von Restriktionsschnittstellen umgeben waren. Diese Restriktionsschnittstellen wurden für die Klonierung in den Integrationsvektor pFIV2-Val verwendet. Das OrfD1 wurde mit dem Myc-tag fusioniert, indem die Myc-tag Sequenz (gaacaaaactaattagtgaagaagacctatga) vor dem Stopcodon angehängt wurde.

2.3.2. Isolation chromosomaler DNA

Zur Isolation der chromosomalen DNA wurde das Blood&Tissue Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurden 2 ml von einer ÜN-Kultur abzentrifugiert und das Bakterienpellet nach dem Herstellerprotokoll lysiert, aufgereinigt und die DNA in 200 µl H_2O_{dd} eluiert. Die chromosomale DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Zur Isolation von DNA aus den Traubenmost-assoziierten Proben wurde neben dem Blood&Tissue Kit auch das MoBio Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories) verwendet. Ein Plasmid (pKoMa2, [230]) zur internen Extraktions- und

Amplifikationskontrolle wurde während der Aufbereitung hinzugegeben. Die Elution erfolgte in 2x 75 µl H₂O_{dd}.

2.3.3. Isolation von Plasmid-DNA

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde das Invidorb® Spin Plasmid Mini Two Kit (Statrec) verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen, wobei die Isolierung aus einer 2 ml ÜN-Kultur erfolgte und die DNA in 50 µl H₂O_{dd} eluiert wurde. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.3.4. Restriktionsverdau von DNA

Zum Verdau von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma NewEngland Biolabs (Massachusetts, USA) nach Herstelleranleitung verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden zwei Enzyme in einem 50 µl Ansatz verwendet, welcher sich folgendermaßen zusammensetzte:

10x Cutsmart Puffer	5 µl
Enzym 1	1 µl
Enzym 2	1 µl
DNA	x µl (~1 µg)
ad	50 µl H ₂ O _{dd}

Je nach Enzym variiert die vom Hersteller angegebene Inkubationstemperatur und –zeit. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme (siehe Tab. 6) wurden bei 37 °C für 15 min inkubiert, ggfs. erfolgte im Anschluss eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme bei entsprechend angegebener Temperatur (60 °C bzw. 80 °C) für 20 min.

Beim Verdau von chromosomaler DNA mit *Hind*III-HF wurden 10 µl chromosomale DNA eingesetzt und anschließend erfolgte eine Inaktivierung des *Hind*III-HF Enzyms bei 80 °C für 20 min.

2.3.5. Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wurden die DNA-haltigen Proben mit 1/10 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat und 3 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt, gut vermischt und ÜN bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der ÜS wurde komplett entfernt, das DNA-Pellet gut getrocknet und anschließend in einem geringem Volumen H₂O_{dd} aufgenommen (10 - 20 µl) und bei -20 °C gelagert.

2.3.6. Ligation mit der T4 DNA-Ligase

Zum Ligieren von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdauen, bei denen mit den gleichen Restriktionsenzyme geschnitten wurde, wurde die T4 DNA-Ligase (NEB) verwendet. In der Regel wurden Vektor und Insert im Verhältnis von 1:3 in einem 20 µl Ligationsansatz eingesetzt:

T4 DNA Ligase	1 µl
T4-Ligase-Puffer	2 µl
Vektor	1 µg
Insert	3 µg
ad 20 µl H ₂ O _{dd}	

Eine Ausnahme stellte die Religation von der *Hind*III-verdauten chromosomalen DNA dar. Hier fand eine Religation in einem 100 µl Ansatz statt:

T4 DNA Ligase	1 µl
T4-Ligase-Puffer	10 µl
<i>Hind</i> III Verdau	10 µl
H ₂ O _{dd}	79 µl

In beiden Fällen erfolgte die Reaktion ÜN bei 16 °C, anschließend wurde die Ligase bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Nach der Fällung des Ligationsansatzes wurde dieser in einem kleinen Volumen H₂O_{dd} aufgenommen (10 – 20 µl) und bei -20 °C gelagert. Die ligierte DNA wurde entweder zur Transformation von Bakterien (siehe II.2.5.) oder zur Bestimmung der Integrationsstelle des Tn5 Transposons (inverse PCR, siehe II.2.3.8.1.) verwendet.

2.3.7. Ligation mit dem pGEM®-T Easy Vektor

Der pGEM®-T Easy Vektor wurde mit dem Kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) verwendet. Hierbei liegt der Vektor in seiner linearisierten Form mit 5'- T-Überhängen vor und lässt sich mit einem PCR Produkt ligieren, welches über 3'- A-Überhänge verfügt. Die TopTaq Polymerase (Qiagen) generiert während der Polymerase-Kettenreaktion diese Überhänge und wurde daher verwendet (siehe II.2.3.8.). Das so erhaltene PCR-Produkt wurde gereinigt (siehe II.2.3.10.) und wie folgt im Ligationsansatz verwendet:

T Easy Ligase	2 µl
T Easy Puffer (2x)	10 µl
pGEM-Teasy Vektor	100 ng
Insert	300 ng
ad 20 µl H ₂ O _{dd}	

Die Ligation wurde bei 4 °C ÜN durchgeführt, anschließend inaktiviert, gefällt (siehe II.2.3.5.) und weiter für die Transformation von *E. coli* Bakterien verwendet (siehe II.2.5.).

2.3.8. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) diente der Amplifikation von chromosomaler oder Plasmid DNA. Dazu wurde die TopTaq DNA Polymerase (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Eine PCR-Reaktion wurde in 50 µl angesetzt:

10x TopTaqPuffer	5 µl
Q-Solution	10 µl
Primer 1 (100 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
TopTaq DNA-Polymerase	0,5 µl
DNA-Template	1 µl
ad 50 µl H ₂ O _{dd}	

Die Reaktionsschritte der PCR waren folgende:

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Primer-Anlagerung	50 - 60 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min/1 kb
abschließende Elongation	72 °C	10 min
Kühlung	16 °C	Pause

Dabei richtet sich die Elongationszeit nach den zu erwarteten DNA-Fragmentgrößen und die Primer-Anlagerungstemperatur wurde 2 - 5 °C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der Primer festgelegt. Die Schritte der Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation wurden in 35 Zyklen wiederholt.

Die RD1-PCR wurde im Rahmen der Diagnostik von Patienten und Umweltproben vom Konsiliarlabor für Tularämie (Prof. Grunow ZBS2, RKI Berlin) durchgeführt. Sie dient der Identifizierung der *Francisella tularensis* Subspezies. Dabei werden die Primer RD1/F und RD1/R verwendet, welche die „Region of Differentiation 1“ amplifizieren und zu unterschiedlichen Produktgrößen in den verschiedenen Subspezies führt: *Ftt* 1522 bp, *Ft mediasiatica* 1453 bp, *Fth* 924 bp, *Fno* 3322 bp [77].

2.3.8.1. Inverse PCR

Die inverse PCR diente der Amplifikation von unbekannten DNA-Sequenzen und wurde genutzt, um die Insertionsstellen des Tn5 Transposon in das Genom des F-W12 bei den Tn5 Scatterklonen zu bestimmen. Dazu wurden die Primer KAN-2 FP-1 und KAN-2 RP-1 verwendet (EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit (Epicentre)). Der Reaktionsansatz wurde mit der TopTaq DNA Polymerase angesetzt (siehe 2.3.8) und als DNA-Template wurden 10 µl der *Hind*III verdauten (siehe 2.3.4.), religierten (siehe 2.3.6) und gefällten (siehe 2.3.5) chromosomalen DNA der Scatterklone verwendet. Die Zyklerbedingungen wurden den Primern (Primer-Anlagerung bei 60 °C) und der zu erwartenden Produktgröße (Elongation für 2 min) angepasst (siehe 2.3.8).

2.3.8.2. Kolonie-PCR (PCR mit ganzen Bakterien)

Die Kolonie-PCR wurde zur schnellen Überprüfung von Klonen nach einer Transformation verwendet. Der Klon wurde zunächst auf Selektivplatter isoliert und kultiviert. In 50 µl H₂O wurde Kolonie-Material des zu überprüfenden Klons resuspendiert, für 10 min bei 100 °C aufgeköcht und anschließend zentrifugiert (5 min 5000 g). Aus dem Überstand (ÜS) wurden 5 µl als DNA-Template in einem 50µl PCR-Ansatz mit der TopTaq DNA Polymerase eingesetzt und die PCR mit den Standardreaktionsbedingungen durchgeführt (siehe 2.3.8).

2.3.9. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Bei der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente, z.B. PCR-Produkte oder DNA aus Restriktionsverdauen, ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde ein 0,9 % -iges Agarosegel in 1x TAE Puffer (siehe 1.13.2) in eine Trägerplatte gegossen. Hierbei wurde ebenfalls ein Kamm miteingeführt, wodurch Taschen im Agarosegel ausgebildet wurden, die zum Auftragen der DNA-Proben dienten. Nach der vollständigen Polymerisation wurde die Trägerplatte mit dem Agarosegel in eine mit 1x TAE Puffer gefüllte horizontale Flachgelapparatur (Bio-Rad) überführt. Die DNA-Proben wurden mit 1 µl DNA-Farbstoff, bestehend aus MidoriGreen Direct (NIPPON Genetics Europe) und Bromphenolblaulösung (im Verhältnis von 1:1), versetzt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für etwa 1 h durchgeführt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein DNA Größenstandard (siehe II.1.12) parallel verwendet.

2.3.10. Gelelution von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel oder einem PCR-Ansatz wurde das „Wizard® SV Gel and PCR clean-up System Kit“ (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Die gereinigte DNA wurde in 50 µl H₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.3.11. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde das “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ verwendet, welches auf dem Prinzip der Sequenzierung nach Sanger basiert [231].

Die in der Sequenzierungs-PCR einzusetzende DNA-Menge war abhängig von der DNA-Template-Größe und -Konzentration:

PCR-Produkt (100 - 200 bp)	1 - 3 ng
PCR-Produkt (200 - 500 bp)	3 - 10 ng
PCR-Produkt (500 - 1000 bp)	10 - 20 ng
Plasmide	150 - 300 ng
sehr große Plasmide	2 - 3 µg

Eine PCR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

DNA	1 - 4 µl
BigDye	0,5 µl
5xPuffer ABI	2 µl
Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
ad 10 µl H ₂ O _{dd}	

Das für die Sequenzierung verwendete PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Initiale Denaturierung	96 °C	2 min
Denaturierung	96 °C	10 sec
Primer-Anlagerung	54 °C	10 sec
Elongation	60 °C	4 min
Kühlung	4 °C	Pause

Die Schritte der Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation wurden in 25 Zyklen wiederholt. Die weitere Aufreinigung und Sequenzierung erfolgte durch die RKI-Abteilung „MF2 Genomsequenzierung“.

2.3.12. Gesamtgenom-Sequenzierung

Die Gesamtgenom-Sequenzierung wurde mittels Sequenzierung der nächsten Generation („Next Generation Sequencing“) von der RKI-Abteilung „MF2 Genomsequenzierung“ durchgeführt und von der RKI-Abteilung „MF1 Bioinformatik“ weiter prozessiert. Zunächst wurde die chromosomale DNA der Proben isoliert (siehe 2.3.2) und anschließend erfolgte eine Library-Generierung und Sequenzierung mittels Illumina. Nach der Qualitätskontrolle, dem Trimmen, der Assemblierung und ggfs. der Kartierung der Sequenzfragmente wurden mir die Sequenzen zur Verfügung gestellt (mehr dazu siehe [85, 217]). Die weitere Auswertung erfolgte mithilfe von Geneious Prime.

2.4. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

2.4.1. *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Stämme (z.B. DH5 α) wurden diese ÜN in 50 ml LB Medium kultiviert. Am nächsten Tag eine Hauptkultur von 250 ml LB Medium mit 10 - 15 ml der ÜN-Kultur inokuliert und für etwa 3 - 4 h kultiviert bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,8 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur bei 4500 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde 3x in kalten 10 % -igem Glycerin gewaschen und jeweils bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der ÜS bis auf 1,5 bis 2 ml verworfen. Das Pellet wurde in der Restflüssigkeit resuspendiert, aliquotiert (à 80 μ l) und bei -80 °C aufbewahrt. Während des gesamten Herstellungsprozesses wurde auf Eis gearbeitet.

2.4.2. *Francisella*

Zur Herstellung elektrokompetenter *Francisella* Stämme wurden die Bakterien in 25 ml Medium T ÜN kultiviert. Anschließend wurden 10 ml der Kultur bei 4600 g und RT für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde 2x in 40 ml 0,5 M Sucrose gewaschen und jeweils bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der ÜS verworfen und das Pellet in der Restflüssigkeit (~ 400 μ l) resuspendiert. Die so hergestellten elektrokompetenten *Francisella* Stämme wurden direkt für die Elektroporation verwendet.

2.5. Transformation von Bakterien

2.5.1. Transformation durch Elektroporation

Für die Transformation von *E. coli* und *Francisella* mit Plasmiden wurde die Elektroporation verwendet. Ein Aliquot des elektrokompetente *E. coli* Stammes (siehe 2.4.1) wurde langsam auf Eis aufgetaut, 0,1 - 1 µg Plasmid hinzugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien-Plasmid-Suspension in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 1 mm; Bio-Rad) überführt, bei 1,7 kV, 400/100 Ω und 25 µF elektroporiert. Für die Elektroporation von *Francisella* wurden die frisch hergestellten elektrokompetenten Zellen verwendet (siehe 2.4.2). Hierbei erfolgte die Elektroporation bei RT, in Elektroporationsküvetten mit 2 mm Spaltbreite und mit folgenden Parametern: 2,5 kV, 600 Ω und 25 µF. In beiden Fällen wurde nach der Elektroporation jeweils 1 ml vorgewärmtes Medium (LB für *E. coli* und Medium T für *Francisella*) hinzugegeben und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 1 h (*E. coli*) bzw. 3 – 4 h (*Francisella*) bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Anschließend erfolgte das Ausplattieren der Bakterien auf Selektivplatten mit dem jeweiligem Antibiotikum des Plasmids und deren Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.5.2. Transformation mittels Hitzeschock

Zur Transformation von *E. coli* wurde neben der Elektroporation auch die Transformation mittels Hitzeschock durch chemisch kompetente Zellen verwendet. Hierbei wurden die OneShot Top10 (DH10B, Invitrogen) *E. coli* Bakterien verwendet. Die Transformation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

2.5.3. Natürliche Transformation von F-W12

Bei der natürlichen Transformation nehmen Bakterien freie DNA aus der ihrer Umgebung auf und integrieren diese über homologe Rekombination ins Genom. Für die natürliche Transformation des F-W12 Stammes wurde eine ÜN-Kultur von F-W12 in 3 ml Medium T hergestellt, welche für die Inokulation der Hauptkultur von 3 ml Medium T in einem Plastikröhrchen diente. Die Hauptkultur wurde kultiviert bis OD₆₀₀ = 1 erreicht wurde (entspricht der exponentiellen Wachstumsphase). Dann erfolgte die Zugabe der gereinigten PCR-DNA (siehe 2.3.10) und eine Kultivierung bei 30 °C und 5 % CO₂ für 3 Tage. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf MTKH-Selektivnährböden (Km oder Hyg) ausplattiert und inkubiert, bis Transformanten sichtbar waren (2 - 3 Tagen). Anschließend wurden sie erneut auf Selektivnährböden ausgestrichen und mithilfe der Kolonie-PCR überprüft (siehe 2.3.8.2).

2.6. Herstellung von Deletionsmutanten

Zur Herstellung von F-W12 Deletionsmutanten wurden synthetisch hergestellte Konstrukte von der Firma GeneCust verwendet (siehe 1.4). Für die Amplifikation der Konstruktvektoren wurden diese in *E. coli* Stämme (DH5 α) transformiert und mithilfe des „Invidorb® Spin Plasmid Mini Two“ Kits (Stratec, siehe 2.3.3) isoliert. Eine PCR mit den M13 Primern wurde zur Amplifikation der Konstrukte durchgeführt. Anschließend wurde die Größe des PCR-Produktes mittels der horizontalen Gelelektrophorese (siehe 2.3.9) überprüft. Das „Wizard® SV Gel and PCR clean-up System“ Kit (Promega) wurde verwendet um das PCR-Produkt zu reinigen (siehe 2.3.10). Für die Mutantengenerierung wurden insgesamt acht 50 μ l PCR Reaktionen vereint und für die natürliche Transformation des F-W12 Stammes verwendet (siehe 2.5.3).

2.7. Komplementationen

Zur Herstellung von Komplementanten wurden synthetisch hergestellten Konstrukte der Firma GeneCust verwendet (siehe 1.4), welche über das Komplementationsgen und Restriktionsschnittstellen verfügten. Für die Amplifikation der Konstrukt-Vektoren wurden diese in *E. coli* Stämme (DH5 α , Stellar) transformiert (siehe 2.5.1) und mithilfe des Invidorb® Spin Plasmid Mini Two“ Kits (Stratec, siehe 2.3.3) isoliert. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau (siehe 2.3.4) des pUC57 Konstrukt-Plasmids und des pFIV2-Val Vektors mit den gleichen Enzymen. Der Verdau wurde mit der Gelelektrophorese (siehe 2.3.9) der Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden ausgeschnitten und mit dem „Wizard® SV Gel and PCR clean-up System“ Kit gereinigt (siehe 2.3.10). Im Anschluss wurde das geschnittene Insert in den pFIV2-Val Vektor mit der T4 Ligase ligiert (siehe 2.3.6). Für die Reinigung und Aufkonzentrierung des Ligationsansatzes wurde eine DNA-Fällung durchgeführt (siehe 2.3.5). Danach erfolgte die Transformation mittels Elektroporation in den Zielstamm (siehe 2.5.1).

Für die Komplementationen mit *peg.278-284* und *glk* wurden die DNA-Sequenzen mithilfe des Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (NEB) entsprechend der Herstellerangaben amplifiziert und anschließend in den pGEM-T Easy Vektor kloniert (siehe II.2.3.7). Die Insert-Sequenz wurde mithilfe der Sanger-Sequenzierung überprüft und Inserts ohne Fehler in den pFIV2-Val kloniert. Weitere Vorgehensweise wie oben beschrieben.

2.8. Herstellung einer Tn5-Mutantenbank

Für die Generierung einer Transposon-Mutantenbank des F-W12 Stammes wurde das „EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™“ Kit (Epicentre) nach Herstellerangaben verwendet. Demnach wurde 1 µl für die Transformation durch Elektroportion in den F-W12 Stamm eingesetzt (siehe 2.5.1). Es wurden verschiedene Volumina (20 – 150 µl) auf Nährböden mit Kanamycin ausplattiert. Nach etwa 2 - 3 Tagen waren Kolonien sichtbar, die mithilfe von PBS von den Platten geschwemmt und in 20 % Glycerin aufgenommen wurden. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die F-W12 Tn5 Mutantenbank enthält somit ein Gemisch an Tn5 Klonen.

2.9. „Scatterscreen“

Beim „Scatterscreen“ handelt es sich um eine Kokultur von Bakterien und mobilen Amöben auf festen Nährböden und diente der Identifizierung von potentiellen Fitnessfaktoren im F-W12 unter Verwendung einer Tn5-Mutantenbank. Das Verfahren wurde ursprünglich für *Legionella* etabliert [232, 233], die Adaptation an *Francisella* erfolgte in dieser Arbeit [85]. Dazu wurde eine 3 Tage alte Amöbenkultur mit einer ÜN-gewachsenen Bakterienkultur im Verhältnis von 100:1 ($10^6/\text{ml}:10^4/\text{ml}$) im IP gemischt (siehe 1.13.2). Die Amöben-Bakterien-Suspension wurde für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, 1:10 verdünnt auf Nährböden ausplattiert und anschließend inkubiert bis Bakterienkolonien sichtbar waren (nach etwa 3 Tagen). Anschließend wurden die Platten zu RT (~22 °C), 25 °C und 37 °C transferiert und täglich begutachtet. Einige Kolonien begannen mit der Zeit ihre Morphologie zu verändern und unscheinbar und blass zu werden, was den Scatterphänotyp darstellte. Diese Kolonien wurden durch größere Ausstriche auf Nährböden von den Amöben isoliert und für weitere Untersuchungen gesichert (siehe 2.1.3).

2.10. Isolierung von primären Alveolarmakrophagen aus der humanen Lunge

Die primären Alveolarmakrophagen wurden von Frau Dr. Fatykhova (Infektiologie, Charité Berlin) aus tumorfreiem Lungengewebe von Bronchialkarzinompatienten isoliert (siehe 1.3). Dabei wurde das Gewebe wiederholt mit HBSS („Hank's Balanced Salt Solution“) gespült und pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in RPMI aufgenommen und pro Napf einer 12-Napfplatte wurden 1×10^5 Zellen gegeben und für 4 h inkubiert, sodass die Zellen adhärieren. Zum Eliminieren der Erythrozyten wurden die Makrophagen wiederholt mit HBSS gewaschen und in RPMI mit 2% FCS für 2 Tage weiter kultiviert, bevor sie für Infektionsversuche verwendet wurden (siehe 2.11.1).

2.11. Infektionsversuche

2.11.1. Zellkultur

Die Modelle (Wirte) der Infektionsversuche sind in Tab. 8 (1.9) aufgeführt. Alle Wirtszelllinien, bis auf die primären Alveolarmakrophagen (siehe 2.10) und U937, konnten direkt für Infektionsversuche verwendet werden. Die Suspensionszelllinie U937 wurde zunächst durch die Zugabe von PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) induziert, sodass sie sich zu einer adhärenz Makrophagen-ähnliche Zelllinie ausdifferenzierte. Dazu wurden die Zellen in große Zellkulturflaschen (175 cm²) 1:3 passagiert, mit 0,05 µg/ml PMA versetzt und für etwa 1,5 Tage kultiviert. Für die Infektion wurden alle Wirtszellen aus konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen gelöst und die Zellzahl/ml mittels der Zellzahlbestimmung nach Neubauer ermittelt (siehe 2.2.1). Nach einem Zentrifugationsschritt (800 rpm, 10 min, RT) wurde das Zellpellet in Medium (RPMI + FCS) bzw. Puffer (IP oder IP_D, siehe 1.13.2) aufgenommen, sodass die Zellsuspension über eine Konzentration von 5×10^5 ZZ/ml verfügte. Zur Bestimmung der CFU/ml bzw. Replikationsrate der Bakterien nach 3 h, 24 h, 48 h, 72 h im Doppelansatz wurden pro Bakterienstamm jeweils 8 Näpfe einer 24-Napfplatte mit je 1 ml der Wirtszellsuspension befüllt. Zum Adhärenzieren der Zellen wurden die Platten für 2 h inkubiert. Die infizierenden *Francisella* Stämme wurden zuvor ÜN in Medium T kultiviert und am Tag der Infektion mit Medium bzw. Puffer auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und weiter bis zu einer Konzentration von 10^6 ZZ/ml verdünnt. Von dieser Bakteriensuspension wurde je 1 ml zu den Zellen in der 24-Napfplatte gegeben (das entspricht einer MOI von 10) und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um den das genaue Inokulum („0 h Wert“) zu bestimmen, wurde die Bakteriensuspension weiter verdünnt (bis 10^4 /ml) und auf Nährböden ausplattiert. Nach der zweistündigen Infektion wurden die Bakterien von den Zellen abgenommen und 2x gewaschen (= Zugabe und Abnahme von je 1 ml Puffer bzw. Medium). Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h, um die extrazellulären Bakterien abzutöten. Nach Entfernen der Gentamicinsuspension wurde erneut 2x gewaschen und 1 ml Medium (RPMI + FCS) bzw. Puffer hinzugegeben. Um die CFU/ml zu Beginn des Experimentes zu bestimmen („Startwert“ bzw. „3h Wert“), wurden die Wirtszellen entweder durch Zugabe von 0,01 % Saponin oder mechanisch lysiert. Anschließend wurde die Suspension auf Nährböden ausplattiert. Zur Bestimmung der CFU/ml zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das gleiche Verfahren angewandt wie zur Bestimmung des 3 h Wertes. Alle Nährböden wurden 1 bis 3 Tage inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren. Die gewachsenen Kolonien wurden anschließend mithilfe des Zellzählers (siehe 2.2.2) ausgezählt und die CFU/ml der jeweiligen Zeitpunkte bestimmt.

2.11.2. *Ex vivo* Lungeninfektionsmodell

Das *ex vivo* Lungeninfektionsmodell wurde in dieser Arbeit nach dem Protokoll für *Streptococcus pneumoniae* von [224, 234] für *Francisella* adaptiert. Die erhaltenen humanen Lungengewebsstücken (siehe 1.3) wurden einzeln in 2 ml RPMI + 10 % FCS in einem Napf einer 24-Napfplatte eingewogen, 1x gewaschen und ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die infizierenden *Francisella* Stämme wurden ÜN in Medium T kultiviert und am Tag der Infektion mit RMPI auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und weiter bis zu einer Konzentration von 10⁶ ZZ/ml verdünnt. Die Bakterien wurden mithilfe einer Infusionsnadel (100 Sterican 0,40 x 20 mm, Braun) in die Gewebsstücke injiziert. Insgesamt wurden 100 µl der 10⁶ Bakterien/ml-Suspension auf 3 Einstichstellen verteilt in das Lungenstück injiziert. Die Infektion wurde für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, zweimal mit RMPI gewaschen und mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt, um die verbliebenen extrazellulären Bakterien zu eliminieren. Die Gentamicin-Suspension wurde abgenommen, die Lungengewebsstücke zweimal gewaschen und mit jeweils 2 ml RPMI versetzt. Für die Bestimmung der CFU/ml bzw. der Replikationsrate nach 3 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Lungenstücke in einer Lysing Matrix D (MP Biomedicals) mit 1 ml PBS und 0,01 % Saponin überführt, im FastPrep (MP Biomedicals) bei 4 m/s für 10 s homogenisiert und für 30 s bei 600 g zentrifugiert sowie auf Nährböden ausplattiert. Die restliche Flüssigkeit aus den Näpfen wurde ebenfalls für die Bestimmung der CFU/ml verwendet. Die Nährböden wurden 1 - 3 Tage bebrütet (bis Kolonien sichtbar waren), und mithilfe des Koloniezähler konnte die CFU/ml bestimmt werden, welche auf das Gewicht des Lungengewebsstück berechnet wurde. Daraus ergab sich die Einheit CFU/ml/g.

2.11.3. Lungendurchfluss

Beim sogenannten Lungendurchfluss handelte es sich um die während des Transportes im Probenbecher gesammelten, aus den bereits geschnittenen Lungengewebsstücken ausgeschwemmten mobilen Zellen (z.B. alveolar Makrophagen, Erythrozyten). Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden die pelletierten Zellen (350 g bei 4 °C für 10 min) in 4,5 ml Wasser für 15 sec resuspendiert und mit 45 ml PBS versetzt und pelletiert [235]. Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauerzählkammer ermittelt (siehe 2.2.1) und das Zellpellet in RPMI + FCS aufgenommen, sodass es die Suspension eine Zellzahl von 10⁵ Zellen/ml besitzt. Von dieser wurde je 1 ml in einen Napf einer 24-Napfplatte gegeben und ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Infektion mit den *Francisella* Stämmen erfolgte nach dem oben

beschriebenen Protokoll (siehe 2.11.1), wobei hier aufgrund der begrenzten Zellmenge jeweils nur Einzelwerte bestimmt werden konnten.

2.12. Wachstumsversuche

Zur Untersuchung des Wachstums im Voll- oder Minimalmedium wurden Wachstumskurven erstellt. In beiden Fällen wurden die Bakterien ÜN im Vollmedium (Medium T) kultiviert. Am nächsten Tag wurden 25 ml frisches Medium mit etwa 3×10^8 Bakterien/ml ($\triangleq OD_{600} = 0,3$) direkt (Medium T) bzw. nach zweimaligem Waschen (Minimalmedium, CDM) inokuliert. Über einem Zeitraum von mindestens 24 h wurde die Bakterienzellzahl mittels Messen der optischen Dichte bestimmt (siehe 2.2.3).

2.13. Stabilitätstestung

Um die Stabilität der Integrationsvektoren pFIV1-Val und pFIV2-Val zu testen, wurden Klone mit den Vektoren ohne Selektionsdruck mehrmals passagiert. Dazu wurden jeweils zwei Klone des F-W12 Stammes mit den Vektoren ÜN in Medium T mit Cm angezüchtet. Von dieser ÜN-Kultur wurden 200 µl zur Inokulation von 3 ml Medium T ohne Antibiotikum verwendet und weiter kultiviert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 10 Mal wiederholt. Nach dem letzten Überimpfungsschritt wurden die Bakterien bis zum Erreichen der stationären Phase weiter kultiviert, anschließend auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und für die CFU/ml-Bestimmung auf Nährböden mit und ohne Cm ausplattiert. Des Weiteren wurden 300 µl Aliquotes der $OD = 1$ Proben für weitere Analysen (Western Blot, PCR Überprüfung) bei -20 °C gelagert.

2.14. *In vitro* ^{13}C - und ^2H -Markierungsversuche mit F-W12

Für die *in vitro* Markierungsversuche im Vollmedium wurden die Bakterien in einer Vorkultur mit 20 ml Medium T ÜN kultiviert. Der Hauptkultur (250 ml Medium T) wurden 2 g/l [$U\text{-}^{13}\text{C}_6$]Glukose (11 mM), 2 g/l [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]Glukose (11 mM), 0,3 g/l [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]Serin (3 mM) oder 2,5 g/l [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]Glycerol (25 mM) zugeführt und mit 2 - 3 ml der ÜN-Kultur inokuliert und für 26 h bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die stationär-gewachsenen Kulturen wurden für 15 min bei 4700 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen, das Pellet bei -20 °C bis zum Autoklavieren gelagert und in 3 ml H_2O resuspendiert. Zum Ausschließen einer Kontamination wurden die Kulturen auf LB-Nährböden ausgestrichen.

Für die Markierungsversuche im Minimalmedium (CDM ohne Glucose [CDM-Glc]) wurde eine ÜN-Kultur im Medium T angelegt, am folgenden Tag pelletiert und 2x im CDM-Glc gewaschen. Der Hauptkultur (200 ml CDM-Glc) wurden sterilfiltriert 1,7 g/l Myo-Inositol-C-

d₆ (9,13 mM) und 3,9 g/l Myo-Inositol (21,65 mM) zugeführt und mit einer OD₆₀₀ von 0,3 inokuliert und für etwa 50 h bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die Ernte der Kulturen erfolgte nach dem gleichen Protokoll bei der Markierung im Vollmedium beschrieben (siehe oben).

2.14.1. Massenspektrometrie – GC/MS

Die autoklavierte Bakterienpellets der *in vitro* ¹³C- und ²H-Markierungsversuche wurde weiter von der AG Eisenreich (Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München) weiterbearbeitet. Dort wurden die Proben aufbereitet und mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert. Generell wurden die freien Metabolite, die Zucker aus Glycerol und der Zellwand sowie die freien und die Protein-gebundenen Aminosäuren isoliert und analysiert. Die Proben wurden aufbereitet und mit einem Quadrupol-GCMS-QP 2010 Plus Spektrometer (Shimadzu, Duisburg) analysiert. Dabei wurde eine Fused-Silica-Kapillarsäure (Equity TM-5; 30 m + 0,25 mm, 0,25 µl Filmdicke, Sigma-Aldrich) verwendet. Die erhaltenen Daten wurden mithilfe der LabSolution Software (Shimadzu) gesammelt. Von allen Proben wurden technische Triplikate angefertigt. Die Gesamt ¹³C- bzw. ²H-Excess-Werte (mol-%) und die relative Isotop-Verhältnis (%) wurde mit der in-house Software (Excel-basierend) bearbeitet [236, 237], nähere Ausführung siehe [215, 216, 238, 239].

2.15. SDS-Stress-Test

Zur Untersuchung der Stabilität der Bakterienhülle (einschließlich Kapsel, Membran und Wand) verschiedener Scatterklone und des Wildtyps wurden diese auf die Sensitivität gegenüber dem Detergens SDS hin untersucht. Dazu wurden die Bakterien für 2 Tage auf MTKH-Nährböden kultiviert, in PBS auf eine Bakterienzahl von 10⁷ ZZ/ml eingestellt und mit 0,1 % SDS für 5 min versetzt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf Nährböden ausplattiert und für etwa 3 Tage inkubiert. Die CFU/ml wurden mithilfe des Acolytes bestimmt (siehe 2.2.2).

2.16. Proteinchemische Methoden

2.16.1. SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe einer SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate [Natriumdodecylsulfat] - Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine entsprechend ihrer Massen aufgetrennt. Die SDS-Gele bestehen jeweils aus einem 12% -igem Trenn- und einem 5% -igem Sammelgel und wurden mithilfe der Mini-Protean Tetra Cell Gelapparatur (Bio-Rad) hergestellt.

Tab. 19: Zusammensetzung der SDS-Gele.

Substanz	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
30% Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30)	4,8 ml	1,33 ml
H ₂ O _d	4,2 ml	4,4 ml
Tris-Puffer	3 ml (1 M, pH 8,8)	2 ml (0,5 M, pH 6,6)
10% SDS (w/v)	120 µl	80 µl
10% APS (w/v) in H ₂ O _d	60 µl	40 µl
TEMED*	7,5 µl	5 µl

* wird erst kurz vor dem Gießen des Gels dazu gegeben, da es zur Polymerisation des Acrylamids führt

Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt und in den Gießstand eingespannt. Das Trenngel wurde in die Gelapparatur gegossen und mit Ethanol überschichtet, sodass eine saubere Trennschicht entsteht. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol entfernt und mit dem Sammelgel überschichtet. Hierbei wurde ein Kamm, welcher zur Ausbildung der Probenaschen diente, mit eingeführt. Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele mitsamt den Glasplatten in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Zum Auftragen der Proben auf das SDS-Gel wurde der Kamm entfernt und mit 1x SDS-Laufpuffer gespült. Die Proben wurden mit dem Probenpuffer (Roti®-Load 1, 4-fach Konzentrat, Bio-Rad) versetzt und für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben und 3 µl des Proteingrößenstandards (siehe II.1.12) auf das SDS-Gel aufgetragen. Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 80 V angelegt, sobald die Proben in das Trenngel gelangt waren, wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

2.16.2. Western Blot (Semi-Dry-Verfahren)

Mithilfe des Western Blots werden die während der SDS-Gelelektrophorese im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran übertragen. Dazu wurde der Semi-Dry-Blotter von PEQLAB Biotechnologie (VWR International, USA) verwendet. Es wurden 6 Filterpapiere und eine NC-Membran auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten, im Towbinpuffer getränkt und auf die Anode in folgender Reihenfolge gelegt: 3 Filterpapiere, NC-Membran, SDS-Gel, 3 Filterpapiere. Anschließend erfolgte das Auflegen der Kathodenplatte und der Transfer wurde für 1:15 h und 0,8 mA pro cm² Membran durchgeführt.

2.16.3. Detektion von Proteinen mit Antikörpern

Die auf einer NC-Membran transferierten Proteine können durch proteinspezifische primäre Antikörper detektiert werden. Die primären Antikörper werden wiederum von sekundären Antikörpern erkannt, an denen eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist und zum Sichtbarmachen der Proteine dient.

Zunächst wurde die Membran nach dem Western Blot mithilfe von 5 % (w/v) Milch in 1x TBS für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C geblockt. Nach einmaligem Waschen mit 1x TBS für 10 min wurde der primäre Antikörper hinzu gegeben, welcher in 1% Milch 1x TBS verdünnt wurde (α IgIC_{W12} 1:100, α c-Myc tag 1:1000, α GFP1:1000, siehe 1.7). Dieser wurde entweder für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit 1x TBS für 10 min wurde der 1:1000 in 1% Milch 1x TBS verdünnte sekundäre Antikörper (α IgIC Kaninchen, α IgIC Maus, siehe 1.7) hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten wurde die Membran mit der ECL-Lösung (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate) und Röntgenfilm entwickelt. Die ECL-Lösung 1 und 2 wurden nach Herstellerangaben verwendet und demnach 1:1 gemischt und auf der Membran für 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Hierbei entsteht Licht durch die Reaktion des Luminols mit H₂O₂ und der Peroxidase. Die Intensität des Signals ist von der Inkubationszeit, der Proteinmenge und der Menge an HRP-gekoppelten sekundären Antikörper abhängig.

2.17. Mikroskopie

2.17.1.1. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Analyse wurden J744 Zellen mit den Bakterien in 25 cm²-Zellkulturflaschen infiziert. Der Infektionsversuch wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt (abweichende MOI: MOI100 und MOI1000; siehe 2.11.1). Nach 6 h, 24 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen fixiert, indem zunächst das restliche Kulturmedium abgenommen und das Klinikfixans bestehend aus 2,5 % Glutaraldehyd und 1 % Paraformaldehyd in 0,05 M HEPES (pH 7,2) für 2 h bei RT hinzugegeben wurde. Anschließend wurde das Klinikfixans gegen PBS ausgetauscht und mit Osmiumtetroxid (1 % in H₂O_{dest}) und Uranylacetat (2 % in H₂O_{dest}) versetzt. Diese Proben wurden weiter von der RKI Abteilung ZBS4 „Elektronenmikroskopie“ bearbeitet. Hier erfolgte eine stufenweise Dehydrierung der Proben mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe und eine Einbettung in LR White Harz (Science Services) durch Polymerisation bei 60 °C ÜN. Anschließend wurden die Proben mit dem Ultramikrotom (UC-7, Leica) geschnitten und mit Uranylacetat und Blei-Citrat

gegengefärbt. Die Analyse und Bildaufnahme erfolgte entweder bei 30 kV mittels des Rasterelektronenmikroskops (Teneo VS FEI/Thermo Fisher) und des STEM-Detektors oder bei 120 kV mithilfe des Transmissionselektronenmikroskops (Tecnai12, FEI) und einer SSCCD Kamera („slow-scan charge-coupled-device“, megaview III, Osis).

2.17.1.2. Konfokal-Mikroskopie

Die primärisolierten humanen Alveolarmakrophagen wurden zum Adhären auf Glasplättchen gegeben (1×10^5 Zellen pro Plättchen) und von den Erythrozyten befreit (siehe 2.10). Nach zweitägiger Inkubation wurden sie mit *Fth* A660 und einer MOI von 10 für 2 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 1 h mit 50 µg/ml Gentamicin behandelt, um die extrazellulären Bakterien abzutöten (siehe 2.11.1). Nach 48 h wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die immunhistochemischen Färbungen wurden von Dr. Fatykhova an der Charité Berlin durchgeführt. Die Präparate wurden mit dem spezifischen Zellmarker für Alveolarmakrophagen (anti-CD68) und den anti-*Fth* LPS Antikörper gefärbt (siehe 1.7) und die Immunfluoreszenz der Proben wurde am LSM 780 (Objektive: Plan Apochromat 63x/1.40 Öl DIC M27 und 40x/1.30 Öl DIC M27; Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert und dokumentiert.

2.18. Software, Statistik und Bioinformatische Auswertung

Für die Erstellung von Graphen und für die statistische Auswertung wurde das Programm „GraphPad Prism Version 8“ verwendet. Um die Normalverteilung von Datensätzen festzustellen, wurde ein Shapiro-Wilk Test durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung wurde entweder ein zweiseitiger *t*-Test oder beim Vergleich von mehr als 2 Gruppen ein „One-way ANOVA“ Test und Dunett Test für multiple Vergleiche angewandt. Die statistische Signifikanz wurde mit den p-Werten * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001 und **** < 0,0001 angenommen. Abbildungen wurden mithilfe von „Adobe Photoshop CS6“ bearbeitet und erstellt. Für die Bestimmung der CFU/ml wurde der Koloniezähler „aCOLyte“ und die dazugehörige Software verwendet. DNA-Sequenzen wurden mit „Geneious Prime“ ausgewertet.

III. Ergebnisse

1. Charakterisierung des neuen *Francisella* Isolates F-W12

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das erst kürzlich identifizierte *Francisella* Umweltisolat F-W12 weiter charakterisiert werden, indem unter anderem nach einer potentiellen Wirtszelle und nach spezifischen Fitnessfaktoren gesucht sowie das *in silico* identifizierte alternative T6SS näher analysiert werden sollte. Teile dieser Ergebnisse wurden bereits publiziert: Tlapák et al. 2018, Köppen et al. 2019, Chen et al. 2020 (in Revision) [214-216].

1.1. Suche nach einer potentiellen Wirtszelle

Für *Francisella* ist die intrazelluläre Replikation in verschiedenen Wirtszellen charakteristisch, z.B. ist die Vermehrung in phagozytierenden Zellen einschließlich Makrophagen und Neutrophilen gut beschrieben [92, 96]. Rydzewski et al. konnte bereits eine Persistenz von F-W12 in der Mausmakrophagenzelllinie J774 und der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 zeigen [165]. Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 8 A). Für die Infektionsversuche wurden die Zelllinien für 2 h und einer MOI von 10 („multiplicity of infection“, genaue Versuchsdurchführung siehe II.2.11) infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µg/ml Gentamicin (Gm) für 1 h behandelt, um die verbliebenen extrazellulären Bakterien abzutöten. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien wurde als Kolonieformende Einheiten („colony forming unit“, CFU/ml) angegeben und jeweils nach 3 h (Startzeitpunkt der Infektion nach der Gm-Behandlung), 24 h, 48 h und 72 h durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Als erstes wurden neben den J774 und U937 Zellen die murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie HD11 für einen Infektionsversuch mit F-W12 verwendet. Über den Versuchszeitraum von 72 h hinweg konnte eine Zunahme der kultivierbaren Bakterien von etwa drei logarithmischen Einheiten (von 10^2 CFU/ml auf 10^5 CFU/ml) festgestellt werden (Abb. 8 B, schwarze Linie). Um zu überprüfen, ob es sich dabei um eine intrazelluläre Replikation oder um eine Kokultur (extrazelluläre Replikation) handelte, wurde dem Medium nach der Infektion 5 µg/ml Gm beigefügt. In diesem Fall war keine Zunahme der kultivierbaren Bakterien erkennbar, jedoch blieb die CFU/ml über 72 h relativ konstant (Abb. 8 B, graue Linie). Die Wirksamkeit des Antibiotikums gegenüber dem F-W12 Stamm wurde zuvor in einem Gm-Sensitivitätstest bestätigt. Die Behandlung mit 50 µg/ml Gm für eine Stunde führte zu einer Reduktion der kultivierbaren Bakterien um drei bis vier logarithmischen Einheiten (Daten nicht gezeigt). Die bisher durchgeführten HD11-Infektionsversuche wurden bei 37 °C durchgeführt, da es sich bei der HD11 Zelllinie um

Makrophagen-ähnliche Zellen eines Huhnes handelt und deren Körpertemperatur höher ist, wurden die Infektionsversuche bei 42 °C wiederholt. Die Erhöhung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 42 °C führte dazu, dass der F-W12 Stamm nach 72 h nicht mehr kultivierbar war, unabhängig davon, ob Gm dem Medium beigelegt wurde oder nicht (Daten nicht gezeigt).

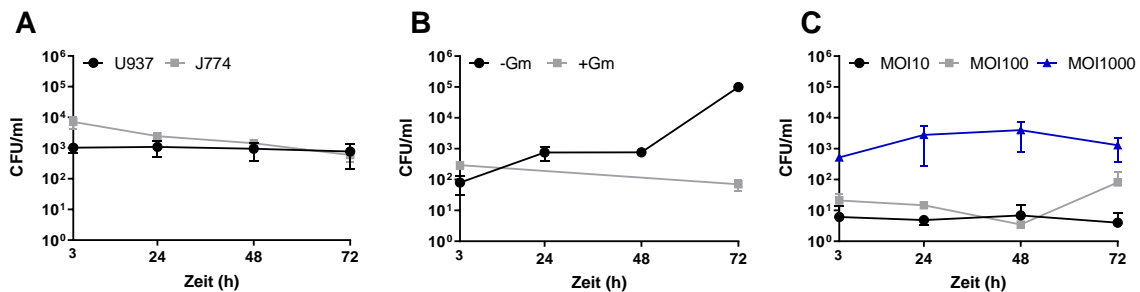


Abb. 8: Infektion der J774, U937 (A), HD11 (B) und der A549 (C) Zellen mit F-W12. A: Die Mausmakrophagen (J774, grau) und die humanen Makrophagen-ähnlichen Zellen (U937, schwarz) wurden für 2 h mit F-W12 und einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch die Zugabe von Saponin lysiert und die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils technischen Duplikaten. B: Nach der Infektion mit den Hühnermakrophagen-ähnlichen Zellen (HD11, Vorgehensweise siehe A) wurden diese in Medium (-Gm, schwarz) bzw. in Medium mit 5 µg/ml Gentamicin (+Gm, grau) weiter kultiviert. Dargestellt sind exemplarisch die Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Versuch mit technischen Duplikaten. C: Für die Infektion der Typ II Alveolarepithelzellen (A549) wurden die Bakterien mit einer MOI von 10 (schwarz), 100 (grau) bzw. 1000 (blau) eingesetzt (sonstige Vorgehensweise siehe A). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit technischen Duplikaten.

Für die weitere Suche nach einer geeigneten Wirtszelle für F-W12 sollten als nächstes Epithelzellen getestet werden. Die Typ II Alveolarepithelzelllinie A549 ist eine geeignete Zelllinie für *Francisella* Replikationsstudien [95, 240, 241]. Hierbei ist jedoch die geringe Invasionsrate zu beachten, nur etwa 0,2 % der A549 Zellen waren nach einer 4 h Infektion nachweislich mit *Fth* LVS infiziert [240]. Daher wurden die Infektionsversuche der A549 Zellen und F-W12 mit unterschiedlichen MOI durchgeführt (siehe Abb. 8 C). Mit einer MOI von 10 bzw. 100 waren etwa 10 - 20 kultivierbare Bakterien nach der 2-stündigen Infektion und der 1-stündigen Gm-Behandlung nachzuweisen (Abb. 8 C, schwarze bzw. graue Linie). Die Erhöhung der eingesetzten Bakterien für die Infektion auf MOI1000 führte dazu, dass nach 3 h durchschnittlich 520 CFU/ml detektiert werden konnten (Abb. 8 C, blaue Linie). Demnach waren in diesem Fall etwa 0,1 % der A549 Zellen mit F-W12 infiziert. Auch in den A549 Zellen wurde keine Replikation des F-W12 beobachtet, jedoch persistierte der Stamm über den gesamten Zeitraum des Experimentes.

Da (zumindest) eine Kokultur von *Francisella* mit Amöben beschrieben ist [242-248], sollte die Amöbenzelllinie *A. lenticulata* 45 und 118 und *D. discoideum* als mögliche Wirtszelle für den F-W12 Stamm getestet werden. Wie in Abb. 9 zu entnehmen ist, repliziert der F-W12 nicht in den *A. lenticulata* 45 bzw. 118 und *D. discoideum*. Es ist jedoch eine Persistenz des F-W12 in den *A. lenticulata* über ein Zeitraum von 10 Tagen zu beobachten (Abb. 9 A). Im Gegensatz dazu nimmt die Anzahl der kultivierbaren Bakterien im Infektionsversuch mit *D. discoideum* um etwa drei logarithmische Einheiten ab. Von anfänglichen $1,8 \times 10^4$ CFU/ml waren nach 72 h nur noch 1×10^1 detektierbar (Abb. 9 B).

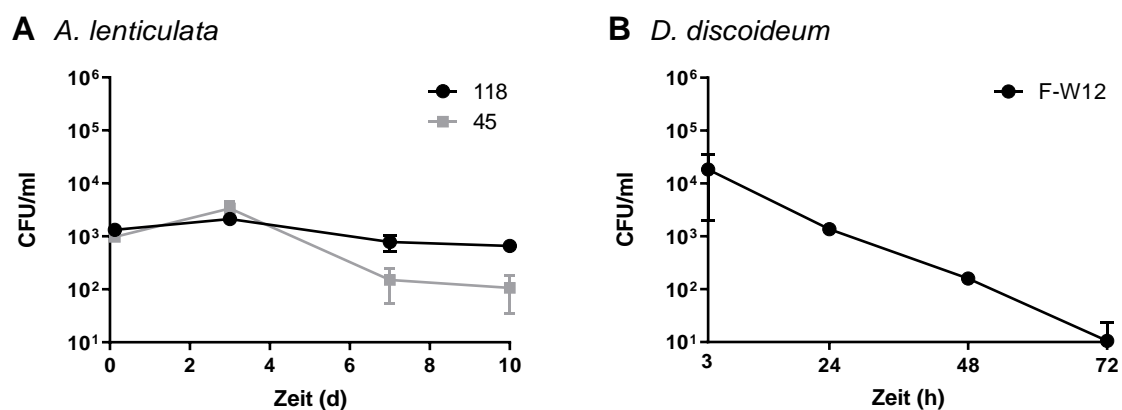


Abb. 9: Infektion von *A. lenticulata* (A) und *D. discoideum* (B) mit F-W12. Die *A. lenticulata* (Stämme: 45 und 118, A) bzw. *D. discoideum* (B) wurden für 2 h mit F-W12 und einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind exemplarisch die Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Versuch mit technischen Duplikaten.

1.2. Alternatives Typ-VI-Sekretionssystem

Der F-W12 Stamm besitzt nicht die für *Francisella* charakteristische FPI, jedoch wurden *in silico* zwei Genominseln identifiziert, die Ähnlichkeiten mit der FPI aufweisen und insbesondere große Homologien mit der zweiten in *Fno* gefundenen Genominsel besitzen. Die FPI codiert in *Francisella* für eine T6SS, welches für die Evasion aus dem Phagosom, die intrazelluläre Replikation und vollständige Virulenz essentiell ist [125, 132, 160, 172, 249]. Die generelle Aufgabe eines T6SS ist es Effektormoleküle über die Membran zu transportieren, welche entweder in eukaryotische oder prokaryotische Zellen injiziert oder in das extrazelluläre Milieu sekretiert werden. Somit kann das T6SS bei der Abwehr gegen andere Bakterien, der Stressantwort oder der Pathogen-Wirt-Interaktion involviert sein. Um zu analysieren, ob die im F-W12 Stamm gefundenen Genominseln für ein alternatives T6SS

codieren, sollte dieses näher untersucht werden. Dabei sollten zwei putative Komponenten („IglC“ und „VgrG“) genauer betrachtet werden, da diese eine wichtige Rolle für das T6SS und die Virulenz in *Francisella* spielen.

Das putative IglC_{W12} in F-W12 wird vom Gen *orfE* (*peg.957*) auf *contig_41* (Genominsel I) und von *orf204* (*peg.1374*) auf *contig_48* (Genominsel II) codiert (Genclusterübersicht siehe I.5 Abb. 5). Die Proteinidentität zueinander beträgt nur etwa 14 % (siehe Tab. 20). OrfE und Orf204 weisen eine Proteinidentität von 14 % bzw. 23 % zum *Fth*-IglC und *Fno*-IglC auf. Die IglC-Proteinsequenzen sind in *Fno* und *Fth* identisch. Das OrfE Protein besitzt eine Proteinidentität zum alternativen *Fno*-IglC (FTN_0044) von 77 %. Das Orf204 der Genominsel II von F-W12 zeigt eine etwas größere Proteinidentität zum *Fno*-/*Fth*-IglC als das OrfE der Genominsel I (23 % vs. 14 %, siehe Tab. 20).

Tab. 20: Proteinidentität der IglC Sequenzen im Vergleich. Analysiert wurden die IglC Proteinsequenzen von *Fth* LVS (FTL_0113), *Fno* U112 (FTN_1322) und die IglC-ähnlichen Proteine von *Fno* (FTN_0044) und F-W12 (OrfE und Orf204). Der Sequenzabgleich ist im Anhang einzusehen.

„IglC“	FTL_0113	FTN_1322	Orf204	FTN_0044	OrfE
FTL_0113	100	100	23	13	14
FTN_1322		100	23	13	14
Orf204			100	13	14
FTN_0044				100	77
OrfE					100

Der phylogenetische Vergleich der IglC Proteine von verschiedenen *Francisella* Spezies bestätigt die Proteinidentitäten (siehe Abb. 10). Der phylogenetische Baum basierend auf einem MAFFT Alignment verdeutlicht die nähere Verwandtschaft des OrfE Proteins mit dem putativen SD_01195 von *A. guangzhouensis* und FTN_0044 von *Fno* sowie die etwas nähere Verwandtschaft des Orf204 Proteins mit den IglC Proteinen von *Fno*, *Fth* und *F. philomiragia*. Jedoch besteht hier kein großes Verwandtschaftsverhältnis. Ebenso wird erkennbar, dass die IglC Proteinsequenz innerhalb von *Francisella* konserviert ist, die IglC Proteine von *Fno*, *Fth* und *F. philomiragia* clustern deutlich (Abb. 10).

Das putative Protein VgrG_{W12} wird von *orfD1* (*peg.950*) auf *contig_41* (Genominsel I) bzw. von *orfD2* (*peg.1364*) auf *contig_48* codiert (Genominsel II, Genclusterübersicht siehe I.5, Abb. 5). OrfD1 und OrfD2 verfügen über eine 20 % Proteinidentität zueinander (siehe Tab. 21). Zum VgrG Protein von *Fno* und *Fth* weist OrfD1 eine Proteinidentität von 23 % und

OrfD2 von 20 % auf. Das VgrG von *Fno* und *Fth* besitzen eine Proteinidentität von 99% zu einander. Die größte Proteinidentität von OrfD1 ist zum alternativen *Fno*-VgrG (FTN_0038) zu verzeichnen, hier beträgt sie 55 % (Tab. 21).

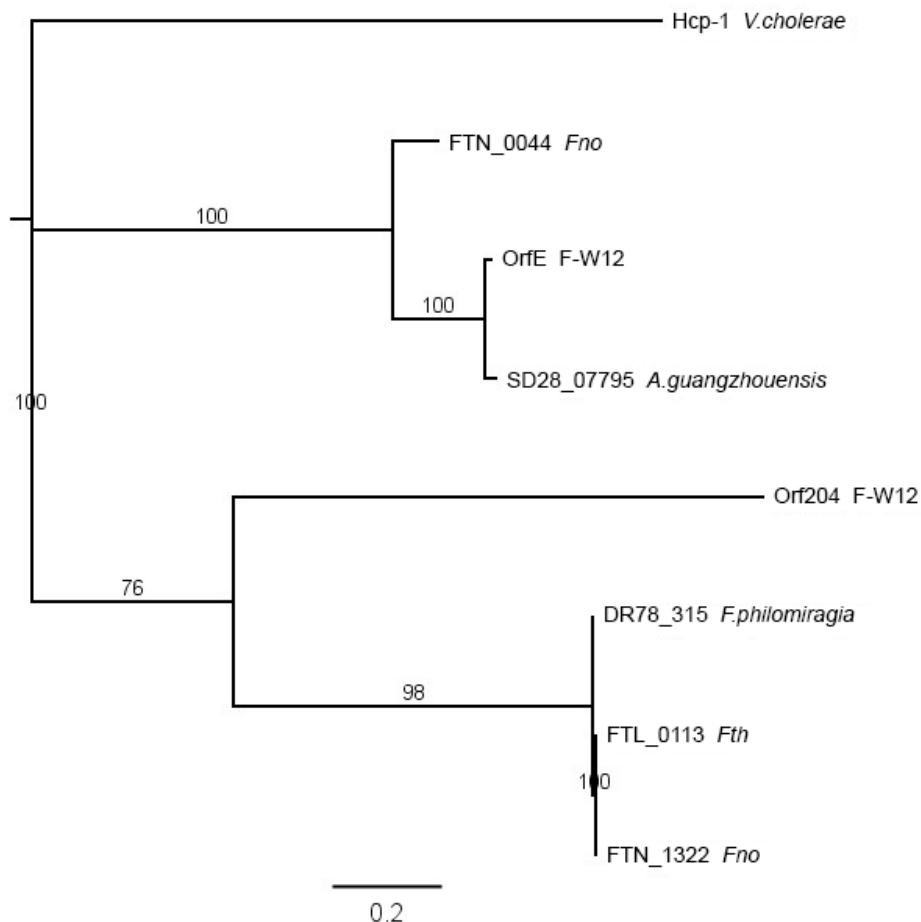


Abb. 10: Phylogenetische Verwandtschaft verschiedener IgIC Proteine. Analysiert wurden die IgIC Sequenzen von *Fth* LVS (FTL_0113), *Fno* U112 (FTN_1322), *F. philomiragia* (DR78_315) und die IgIC-ähnlichen Proteine von *Fno* (FTN_0044), *A. guangzhouensis* (SD28_01195) und F-W12 (OrfE und Orf204). Es wurde ein Proteinsequenzalignment (MAFFT) durchgeführt und daraus ein phylogenetischer Baum (mit Bootstrap-Test, Jukes-Cantor) mit Hcp-1 von *V. cholerae* als Außengruppe mit der Neighbor-Joining Methode generiert. Die Astlängen repräsentieren die evolutionäre Verwandtschaft, dargestellt durch den Maßstabsbalken, welcher 0,2 Austausche pro Aminosäure angibt. Die Zahlen an den Ästen geben den Konsensus Support in Prozent an. Der Sequenzabgleich ist im Anhang einzusehen.

Die phylogenetische Analyse der *Francisella* VgrG Proteine zeigt, dass das OrfD1 näher verwandt mit dem SD28_01165 von *A. guangzhouensis* und dem alternativen VgrG der 2. Insel von *Fno* (FTN_0038) ist (siehe Abb. 11). Ebenso wird deutlich, dass die VgrG Proteine von *Fno*, *Fth* und *F. philomiragia* zusammen gruppieren. Das OrfD2 von F-W12 ist näher mit den alternativen „VgrG“ Proteinen von F-W12, *A. guangzhouensis* und *Fno* verwandt, jedoch besteht auch hier kein großes Verwandtschaftsverhältnis (Abb. 11).

Tab. 21: Proteinidentität der VgrG Sequenzen im Vergleich. Analysiert wurden die VgrG Proteinsequenzen von *Fth* LVS (FTL_0123), *Fno* U112 (FTN_1312) und die VgrG-ähnlichen Proteine von *Fno* (FTN_0038) und F-W12 (OrfD1 und OrfD2). Der Sequenzabgleich ist im Anhang einzusehen.

„VgrG“	FTL_0123	FTN_1312	FTN_0038	OrfD1	OrfD2
FTL_0123	100	99	26	23	20
FTN_1312		100	26	23	20
FTN_0038			100	55	19
OrfD1				100	20
OrfD2					100

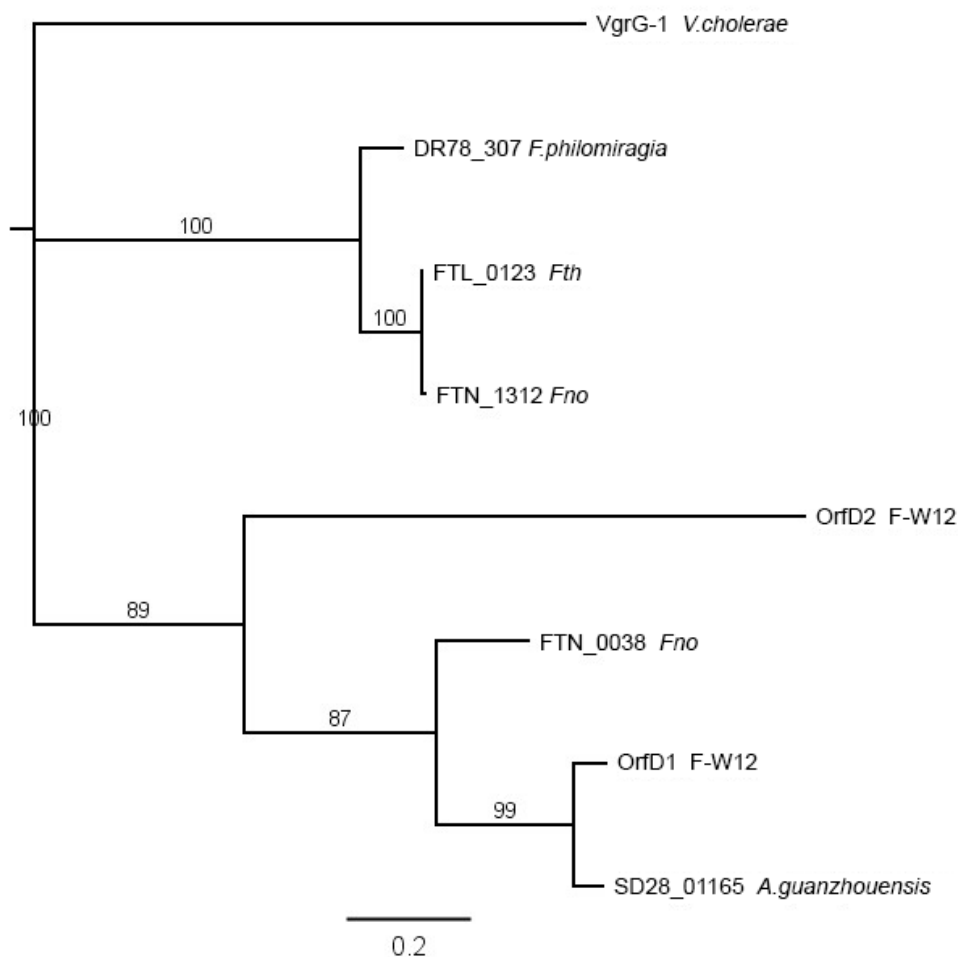


Abb. 11: Phylogenetische Verwandtschaft verschiedener VgrG Proteine. Analysiert wurden die VgrG Sequenzen von *Fth* LVS (FTL_0123), *Fno* U112 (FTN_1312), *F. philomiragia* (DR78_307) und die VgrG-ähnlichen Proteine von *Fno* (FTN_0038), F-W12 (OrfD1 und OrfD2) und *A. guanzhouensis* (SD28_01165). Es wurde ein Proteinsequenzalignment (MAFFT) durchgeführt und daraus ein phylogenetischer Baum (mit Bootstrap-Test, Jukes-Cantor) mit VgrG-1 von *V. cholerae* als Außengruppe mit der Neighbor-Joining Methode generiert. Die Astlängen repräsentieren die evolutionäre Verwandtschaft, dargestellt durch den Maßstabsbalken, welcher 0,2 Austausche pro Aminosäure angibt. Die Zahlen an den Ästen geben den Konsensus Support in Prozent an. Der Sequenzabgleich ist im Anhang einzusehen.

1.2.1. Generierung von Deletionsmutanten

Zur Untersuchung des alternativen T6SS (aT6SS) in F-W12 wurden Deletionsmutanten der Gene *impB-orfE* (umfasst „*iglA/B/C*“), *orfD1* („*vgrG*“), *impB2C2* („*iglA2/B2*“) und eine Doppeldeletionsmutante der Gene *impB-orfE* und *impB2C2* generiert. Für die Herstellung dieser Mutanten wurden Konstrukte verwendet (pImpB-orfE, pImpB2C2, pOrfD1, pPeg.278-284; siehe II.2.6, Tab. 4), die ein Antibiotika-Resistenzgen (für Km oder Hyg) besaßen, welches von Genomsequenzen (etwa 1 kb) des zu deletierenden Gens flankiert wurde (siehe Abb. 12 A).

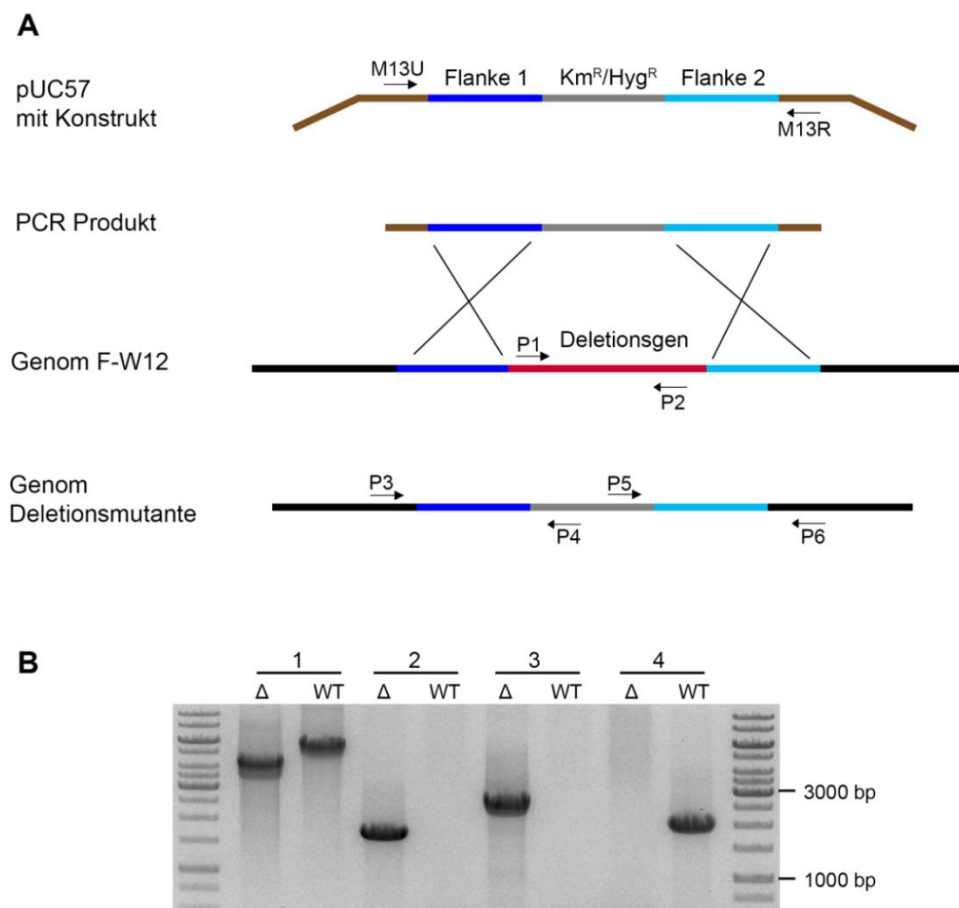


Abb. 12: Herstellung der F-W12 Deletionsmutanten. **A:** Für die Generierung der F-W12 Mutanten wurden mithilfe einer PCR (M13U+M13R) die Konstrukte bestehend aus einem Antibiotikaresistenzgen (Km oder Hyg, grau) und Genomsequenzen up- (Flanke 1, dunkelblau) und downstream (Flanke 2, hellblau) des zu deletierenden Gens (rot) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde isoliert, gereinigt und mittels natürlicher Transformation und homologer Rekombination in den F-W12 Stamm eingebracht (Kreuze symbolisieren das Doppel-Crossover). Bei einer erfolgreichen Transformation fand ein Austausch des zu deletierenden Gens mit der Antibiotikaresistenzkassette statt. Pfeile symbolisieren Primer; das Genom ist in Schwarz dargestellt. Alle Transformanten wurden auf das Fehlen des Deletionsgens (P1 + P2, Primer liegen innerhalb des Gens) und auf das Vorhandensein der Antibiotikaresistenz (P3 + P4, P5 + P6; P3 + P6) hin überprüft. **B:** PCR-Überprüfung der $\Delta impB-orfE$ Mutante (K1.53). 1: M_impB_test_U (P3) + M_impB_test_R (P6) mit 4335 bp in $\Delta impB-orfE$ Mutante (Δ) und 5773 bp in F-W12 (WT); 2: M_impB_test_U (P3) + Km_Seq_1U (P4) mit 1694 bp in Δ; 3: Km_Seq_F (P5) + M_impB_test_R (P6) mit 2577 bp in Δ; 4: impB1_F (P1) + orfE_R* (P2) mit 1993 im WT. M: Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Dieses Konstrukt wurde amplifiziert, in den F-W12 Stamm transformiert und mittels homologer Rekombination in das Genom des F-W12 eingebaut und führte somit zum Austausch des Deletionsgens mit dem Antibiotika-Resistenzgen (siehe Abb. 12 A). Die so hergestellten Deletionsmutanten des F-W12 ($\Delta impB-orfE$, $\Delta orfD1$, $\Delta impB2C2$ und $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$) wurden mittels PCR Analysen überprüft (siehe Abb. 12 B). Dabei wurden die Mutanten auf das Vorhandensein des Antibiotika-Resistenzgens (Abb. 12 B PCR 2 und 3) und auf das Fehlen des Deletionsgens (Abb. 12 B PCR 1 und 4) untersucht. Zusätzlich wurden alle generierten Mutanten mithilfe der Sanger-Sequenzierung bestätigt und auf mögliche *in vitro* Wachstumsdefizite im Vollmedium untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass die Mutationen das *in vitro* Wachstum nicht beeinflussten, da die Mutanten wie der Wildtyp F-W12 eine ähnliche Wachstumskurve zeigten und eine maximale OD₆₀₀ von etwa 1,9 nach 24 h erreichten (siehe Anhang Tab. 27).

1.2.2. Komplementierung der Deletionsmutanten

1.2.2.1. Etablierung des Integrationsvektors FIV-Val in F-W12

In dieser Arbeit wurde die Komplementierung der generierten F-W12 Deletionsmutanten mithilfe des Integrationsplasmids pFIV2-Val durchgeführt ([214], Vektorkarten siehe Anhang). Das Plasmid basiert auf einem pUC57-kana Vektor, verfügt über einer ortsspezifischen Integrase (FN3523_1033), *attL*- und *attR*-Stellen, einer Chloramphenicolresistenzkassette sowie einem *sacB* Gen und nutzt die tRNA-Val als Integrationsort. Durch die Transformation in *Francisella* sorgt das *sacB* Gen, welches sich auf dem pUC57-kana Teil befindet, für eine negative Selektion beim Wachstum auf Sucrose-haltige Platten. Dadurch geht der pUC57-kana-Vektorteil verloren und der FIV-Teil bildet eine zirkuläre episomale Form, welche auch ortsspezifisch in die tRNA-Val ins Genom integrieren kann. Dem pFIV1-Val Vektor, eine Vorstufe des pFIV2-Val Vektors, fehlt das *sacB* Gen und verfügt zusätzlich über ein *gfp* Gen im FIV1-Val-Teil. Dadurch müssen die erhaltenen F-W12 FIV1-Val Transformanten zusätzlich auf eine Km-Sensibilität untersucht werden, denn nur Km-sensitive Klone haben den pUC57-Teil verloren und der FIV1-Val-Teil liegt in der chromosomal-integrierten und episomalen Form vor (siehe Abb. 13 B, Abb. 14). Die Funktionalität der pFIV-Val Vektoren sollte zunächst für den F-W12 Stamm überprüft werden. Nach der Transformation von pFIV1-Val und pFIV2-Val in F-W12 wurden die vektorspezifischen Formen nachgewiesen. Um die Stabilität zu überprüfen wurden die F-W12 FIV-Val Transformanten 10-mal in Medium ohne Selektionsdruck (Antibiotikum) passagiert und anschließend auf Nährböden mit bzw. ohne Antibiotikum (Cm) ausplattiert (siehe Abb.

13 A). Wie in Abb. 13 A zu sehen ist, waren die Plasmide FIV1-Val und FIV2-Val im F-W12 stabil, da kein Unterschied in der Anzahl der kultivierbaren Bakterien auf Nährböden mit bzw. ohne Cm erkennbar war. Für den Nachweis der vektorspezifischen Formen wurde die chromosomale DNA aus den Kulturen isoliert und für PCR-Analysen verwendet. Die episomale Form wurde mittels der Primerkombination Phage2 + Phage3 und die chromosomal-integrierte Form mittels Phage1 + Phage2 sowie Phage3 + Phage4 nachgewiesen. Ebenso konnte das *gfp* Gen mittels PCR sowie das GFP-Protein mittels Western Blot Analysen in F-W12 FIV1-Val bestätigt werden (Abb. 13 B + C). Demnach sind beide Varianten des Plasmids in F-W12 funktional und auch ohne Selektionsdruck stabil und konnten für Komplementierungen verwendet werden.

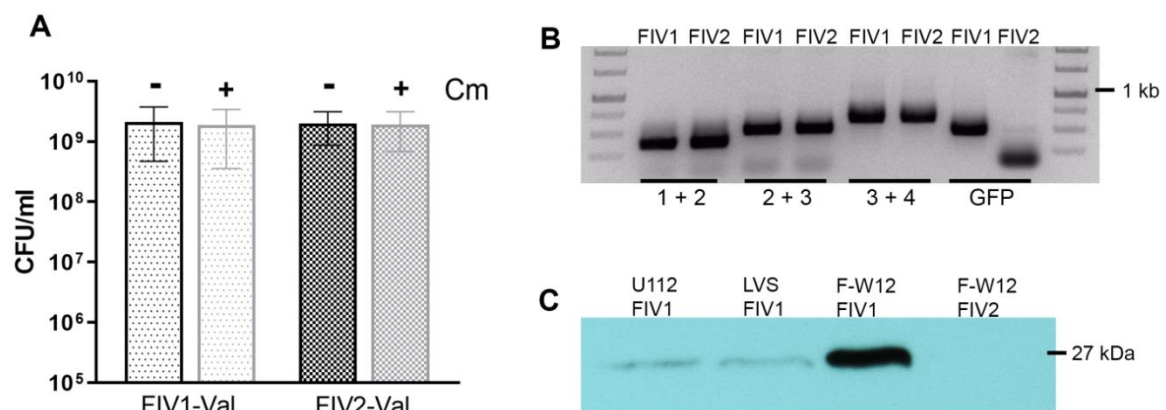


Abb. 13: Etablierung der Integrationsvektoren FIV1-Val und FIV2-Val in F-W12. Für die Stabilitätstestung wurden die Stämme F-W12 FIV1-Val und F-W12 FIV2-Val zehnmals in Medium T ohne Antibiotikum passagiert. Anschließend wurden die Stämme auf das Vorhandensein der Vektoren überprüft. **A:** Die Proben wurden auf Nährböden mit (+) bzw. ohne (-) Antibiotikum (Cm) ausplattiert und die Anzahl der kultivierbaren Bakterien (CFU/ml) bestimmt. **B:** PCR-Analysen zum Nachweis der vektorspezifischen Formen. Die episomale Form wurde mittels den Primern Phage2 + Phage3 (2 + 3, PCR-Produktgröße: 480 bp) nachgewiesen und die chromosomal-integrierte Form mit Phage1 + Phage2 (1 + 2, Größe: 360 bp) sowie Phage3 + Phage4 (3 + 4, Größe: 606 bp). Mithilfe des Primerpaars *gfpF* + *gfpR* (GFP) wurde das *gfp*-Gen nachgewiesen. **C:** Die Proben wurden im Western Blot auf das Vorhandensein des GFP Proteins hin untersucht (Ganzzelllysate, α -GFP Antikörper). Zum Vergleich wurden die Stämme *Fno* U112 FIV1 und *Fth* LVS FIV1 mit untersucht. Verändert nach Tlapák et al. 2018 [214].

1.2.2.2. Komplementierung mit *impB-orfE* und *orfD1*

Nachdem die Integrationsvektoren pFIV-Val in F-W12 etabliert wurden, wurde der pFIV2-Val Vektor für die *trans*-Komplementation in F-W12, *Fth* LVS und *Fno* U112 mittels der Konstrukte (pImpB-*orfE* komp, pOrfD1 komp, pOrfD1 Myc; siehe II.2.7, Tab. 4) verwendet. Diese Konstrukte (in pUC57) verfügten über das Komplementationsgen mit entsprechenden up- und downstream Genomsequenzen sowie Restriktionsschnittstellen (siehe

Abb. 14 A). Diese wurden mittels Restriktionsverdau geschnitten und in den pFIV2-Val ligiert. Abweichend davon wurden für die Komplementationen für *glk* und *peg.278-284* (siehe II.2.7) die entsprechenden Genbereiche mittels PCR amplifiziert und in den pGEM-T Easy Vektor ligiert. Die Insert-DNA-Sequenzen wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft und anschließend in den pFIV2-Val Vektor kloniert.

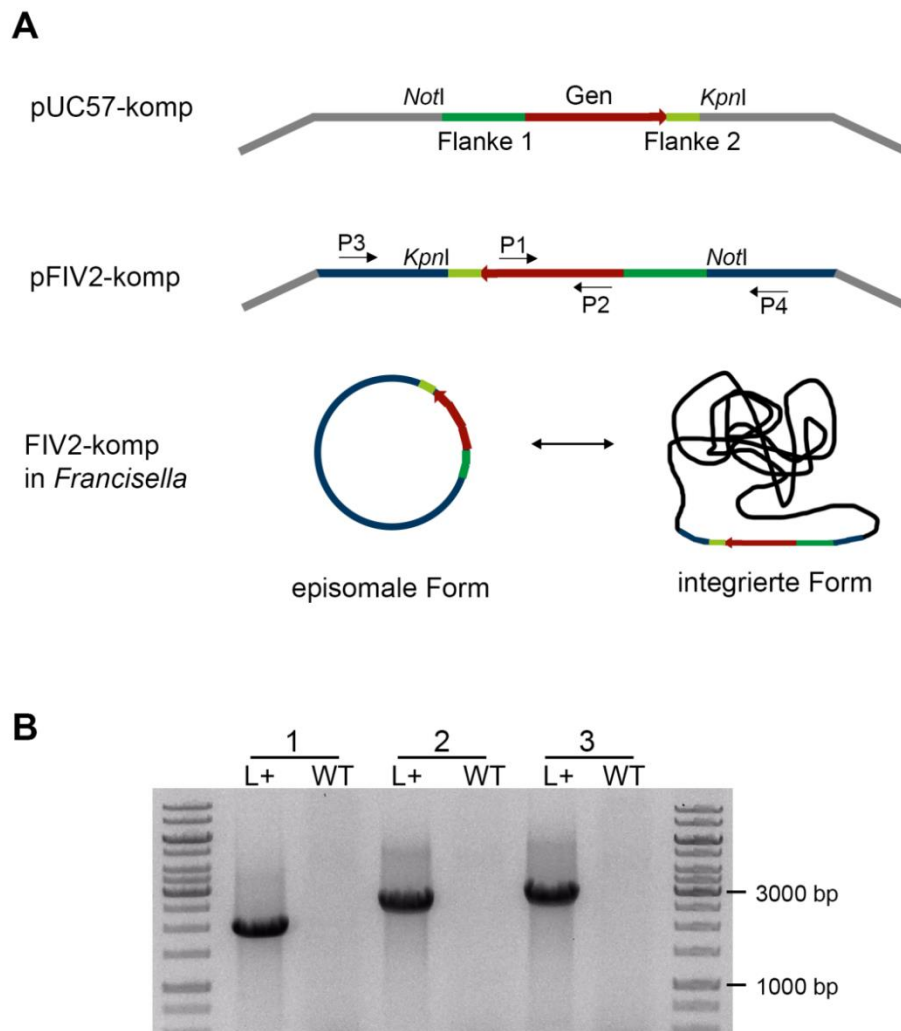


Abb. 14: Schema der *trans*-Komplementation in *Francisella*. **A:** Für das Komplementieren von F-W12, *Fth* LVS und *Fno* U112 wurden Konstrukte verwendet, welche aus der DNA-Sequenz des Komplementationsgens (rot) und 300 bzw. 60 bp der up- (hellgrün) bzw. downstream Genomsequenzen (dunkelgrün) bestanden. Diese Konstrukte wurden mit Restriktionsenzymen (*NotI*, *KpnI*) geschnitten und in den Vektor pFIV2-Val kloniert und anschließend in *Francisella* mittels Elektroporation eingebracht. Der Komplementationsvektor (FIV2-komp) liegt nun in der episomalen und in der chromosomal-integrierten Form in *Francisella* vor. Farbkodierung: Vektorsequenz (pUC57) in Grau; FIV2-Sequenz in Blau; *Francisella* Genom in Schwarz; P1 bis P4 sind Primer. **B:** PCR-Überprüfung der *Fth* LVS Δ *iglC* FIV2-*impB-orfE* Komplementante (Kl. 2). Die PCR 1 diente des Nachweises des Komplementationsgens: *impB1_F* (P1) + *orfE_R** (P2) mit 1993 bp in der Komplementante (L+); PCR 2 zeigte den Übergang zwischen FIV2 und dem Komplementationsgen: *orfE_R** (P2) + *GroES* (P3) mit 2633 bp in L+; PCR 3 zeigte den Übergang zwischen dem Komplementationsgen und FIV2: *impB1_F* (P1) + *Phage5* (P4) mit 2933 bp in L+. Als Negativkontrolle wurde der Wildtyp *Fth* LVS (WT) mitgeführt. M: Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Verändert nach Tlapák et al. 2018 [214].

Die Gene wurden jeweils so in den Vektor kloniert, dass sie unter dem Einfluss der auf dem Vektor befindlichen Promotoren waren. Der ligierte pFIV2-komp Vektor wurde anschließend in die *Francisella* Stämme mittels Elektroporation transformiert. Die daraus resultierenden Transformanten wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Komplementationsgens und der entsprechenden Übergänge zum FIV2-Teil überprüft (siehe Abb. 14 B). Neben der *trans*-Komplementation der Deletionsmutanten im F-W12 ($\Delta impB-orfE$, $\Delta orfD1$, $\Delta impB2C2$ und $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$) mit *impB-orfE* bzw. *orfD1*-Myc wurden auch *Fth* LVS $\Delta iglC$ und *Fno* U112 $\Delta iglC$ mit den *impB-orfE* Genen von F-W12 transformiert. Ebenso wurde die LVS $\Delta vgrG$ Mutante mit FIV2-*orfD1* transformiert. Alle generierten Komplementanten zeigten kein *in vitro* Wachstumsdefizit im Vollmedium (siehe Anhang Tab. 27).

1.2.3. Analysen zu OrfE (IglC_{F-W12}) und OrfD1 (VgrG_{F-W12})

1.2.3.1. Antikörperherstellung

Für die Detektion von OrfE (IglC_{W12}) und OrfD1 (VgrG_{W12}) sollten Antikörper hergestellt werden. Die Antikörperherstellung wurde von der Firma Life Tein LLC, Hillsborough, New Jersey, USA vorgenommen. Innerhalb der Aminosäuresequenzen wurde nach Bereichen mit hydrophilem Charakter gesucht, da sich diese vorrangig an der Oberfläche des gefalteten Proteins befinden und sich somit gut als Antigen und Erkennungsstelle für Antikörper eignen. Vom dem 214 aa großem OrfE Protein wurden die Positionen 189 bis 210 (NH₂-EKGTPISTWTSDSSQKIVVGV-COOH) für die Antikörpergenerierung ausgewählt (siehe Abb. 15, links). Von dem deutlich kleineren OrfD1 Protein (92 aa) wurden die Positionen 26 bis 46 (NH₂-TLSQKDESAKLAKETTIE-COOH) als Antigen selektiert (siehe Abb. 15, rechts). Die ausgewählten Peptidsequenzen wurden über eine Linker-Aminosäure (Cystein) an das KLH-(Keyhole Limpet Hemocyanin)-Protein konjugiert. Im Falle des 21-mer OrfE Peptids erfolgte die Konjugation am N-Terminus und im Falle des 20-mer OrfD1 Peptids am C-Terminus. Die Konjugation an das KLH-Molekül diente der Immunisierungsmaximierung. Diese ausgewählten KLH-konjugierten Antigene wurden anschließend zur Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen verwendet. Die Peptid-Antikörper wurden mittels Affinitätsreinigung isoliert. Als erstes sollte die Spezifität der Antikörper überprüft werden. Dazu wurden Zelllysate des F-W12 Stammes, der $\Delta impB-orfE$ und $\Delta orfD1$ Mutanten hergestellt und mittels SDS-PAGE und Western Blots analysiert. Mithilfe des OrfE-Antikörpers (α -OrfE) konnte eine Bande etwas unterhalb der 25 kDa-Markierung in der Wildtyp-Probe detektiert werden, welche in der $\Delta impB-orfE$ Mutante fehlte (siehe Abb. 16).

Daraus lässt sich folgern, dass der OrfE-Antikörper spezifisch das 23 kDa-große OrfE Protein erkennt. Im Gegensatz dazu war eine Detektion von OrfD1 mithilfe des OrfD1-Antikörpers nicht möglich. Der Antikörper wies nur unspezifische Kreuzreaktionsbanden auf, die im Wildtyp und in der $\Delta orfD1$ Mutante auftraten und nicht die Größe des OrfD1 Proteins (10 kDa) besaßen (Daten nicht gezeigt).

OrfE (214 aa)	OrfD1 (92 aa)
<div> <div>10203040</div> <div> <div> </div> <div> </div> <div> </div> <div> </div> </div> </div> <div> MSDFIAIDGQKMVLTPNSHPSANLTSPSPTHDAVFLELKF SAEAGPADLTKTIPIYYDVGTTPGSAAVNFKLEHGDFDAV NQITIVLHLRTTKTIVSELNKAITKLLSSGAKAQLSVEIAS ANDKQTVDPQANKGTIVKYFDPQGAFTLCCEKTRQFQHLL AHECGDLYSRSATNNETELTGTTIIISGKWEKGTPISTWTS <u>DSSQKIVGV</u>DSGK </div>	<div> <div>1020</div> <div> <div> </div> <div> </div> </div> </div> <div> MADNNNNFFEITSDDITINA NQKTIIL<u>TL</u><u>SQKDESAKLTAK</u> <u>ETTIE</u>CKDKIILKCGSNSIE INSSTVIIKCGESSVELSSS GVSIKGTSLNLD </div>

Abb. 15: Aminosäuresequenzen des OrfE (IglC_{W12}) und OrfD1 (VgrG_{W12}). Unterstrichen und fett markiert ist das 21-mer Peptid (OrfE) bzw. 19-mer Peptid (OrfD1) für die Herstellung der Antikörper in Kaninchen.

1.2.3.2. Analysen zu OrfE (IglC_{W12}) in F-W12

Zunächst sollte die Expression und die Sekretion des putativen OrfE Proteins (IglC_{W12}) in F-W12 untersucht werden. Für das IglC von *Fth* und *Fno* konnte bereits gezeigt werden, dass IglC sekretiert wird bzw. im Kulturüberstand nachzuweisen ist und sich die Sekretion durch die Zugabe von Kaliumchlorid (KCl) im Medium erhöht [169, 183]. Daher wurde der Wildtyp F-W12 und die Mutanten $\Delta impB-orfE$, $\Delta impB2C2$, $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$ und $\Delta orfD1$ sowie deren Komplementationen mit FIV2-*impB-orfE* in Medium mit 5 % bzw. ohne KCl kultiviert. Die stationär gewachsenen Kulturen wurden pelletiert, der daraus resultierende Überstand (ÜS) und das Zellpellet separat untersucht. Die erhaltenen Ganzzelllysate (Kulturpellets) wurde auf eine Zellkonzentration von 10^9 Zellen/ml (entspricht OD₆₀₀ = 1) eingestellt. Die erhaltenen Kultur-ÜS wurden filtriert und gefällt. Von den Proben wurden jeweils gleiche Mengen für die Auftrennung in einer denaturierenden SDS-PAGE-Analyse und anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran verwendet. Nachfolgend wurde der Primär-OrfE-Antikörper (1:100 verdünnt) und der HRP-gekoppelte α -Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000) verwendet. Zur Detektion des OrfE-Proteins wurde weiter die hochsensitive ECL-Lösung eingesetzt (siehe II.2.16). Wie der Abb. 16 A zu entnehmen ist, konnte das 23 kDa große OrfE Protein im Zelllysate und im Kultur-ÜS in den Stämmen F-W12 (Spur 1, 2, 7, 8), $\Delta impB2C2$ (Spur 3, 4) und $\Delta orfD1$ (Spur 5, 6) detektiert werden, jedoch

nicht im OrfE-Mutantenstamm $\Delta impB-orfE$ (Spur 9, 10) und nicht in der Doppelmutante $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$ (Spur 11, 12). Mithilfe des Integrationsvektors pFIV2-Val konnten die $\Delta impB-orfE$ und $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$ Stämme erfolgreich mit den *impB-orfE* Genen *in trans* komplementiert werden. Bei den Komplementanten konnte das OrfE erfolgreich im Zellpellet und im ÜS detektiert werden (Spur 13 - 16). Die Zugabe von KCl führte zu einer geringfügig stärkeren 23 kDa-Bande im ÜS von F-W12 (Spur 1, 2, 7, 8), $\Delta impB2C2$ (Spur 3, 4) und $\Delta orfD1$ (Spur 5, 6) (Abb. 16 A, unterer Streifen). Im Gegensatz dazu schien die Menge an OrfE in den Zelllysaten und ÜS der Komplementanten ($\Delta impB-orfE$ mit FIV2-*impB-orfE* und $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$ mit FIV2-*impB-orfE*) eine stärkere Intensität zu besitzen, wenn diese im Medium ohne KCl kultiviert wurden (Abb. 16 A, vergleiche Spur 13 vs. 14 sowie 15 vs. 16). Die Bandenintensität des OrfE Proteins scheint im Zellpellet der Deletionsmutanten $\Delta impB2C2$ (Spur 3, 4) und $\Delta orfD1$ (Spur 5, 6) geringfügig schwächer zu sein als die im Wildtyp F-W12 (Spur 1, 2, 7, 8; Abb. 16).

Ferner wurde für *Fno* U112 und *Fth* LVS gezeigt, dass eine Deletion von *iglC* zum Pathogenitätsverlust *in vitro* und *in vivo* der Stämme führt [122, 123, 250]. Daher sollte der Einfluss einer *impB-orfE* Deletion auf das intrazelluläre Verhalten von F-W12 untersucht werden. Dazu wurde die Mausmakrophagenzelllinie J774 für Infektionsversuche verwendet. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 mit den verschiedenen F-W12 Stämmen für 2 h infiziert und anschließend mit Gentamicin behandelt, um die extrazellulären Bakterien abzutöten. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (3 h, 24 h, 48 h, 72 h) bestimmt, indem die J774 Zellen mit Saponin lysiert wurden und die Suspension auf Nährböden gebracht wurde. Wie der Abb. 16 B zu entnehmen ist, besaßen die Deletionen der Gene *impB-orfE* keinen Einfluss auf das *in vivo* Verhalten des F-W12 in den J774 Zellen. Die Mutanten und die *trans* Komplementanten persistierten wie der Wildtyp über den gesamten Zeitraum von 72 h. In keinem Fall war eine Replikation oder abweichende Reduktion der Bakterienzahl erkennbar.

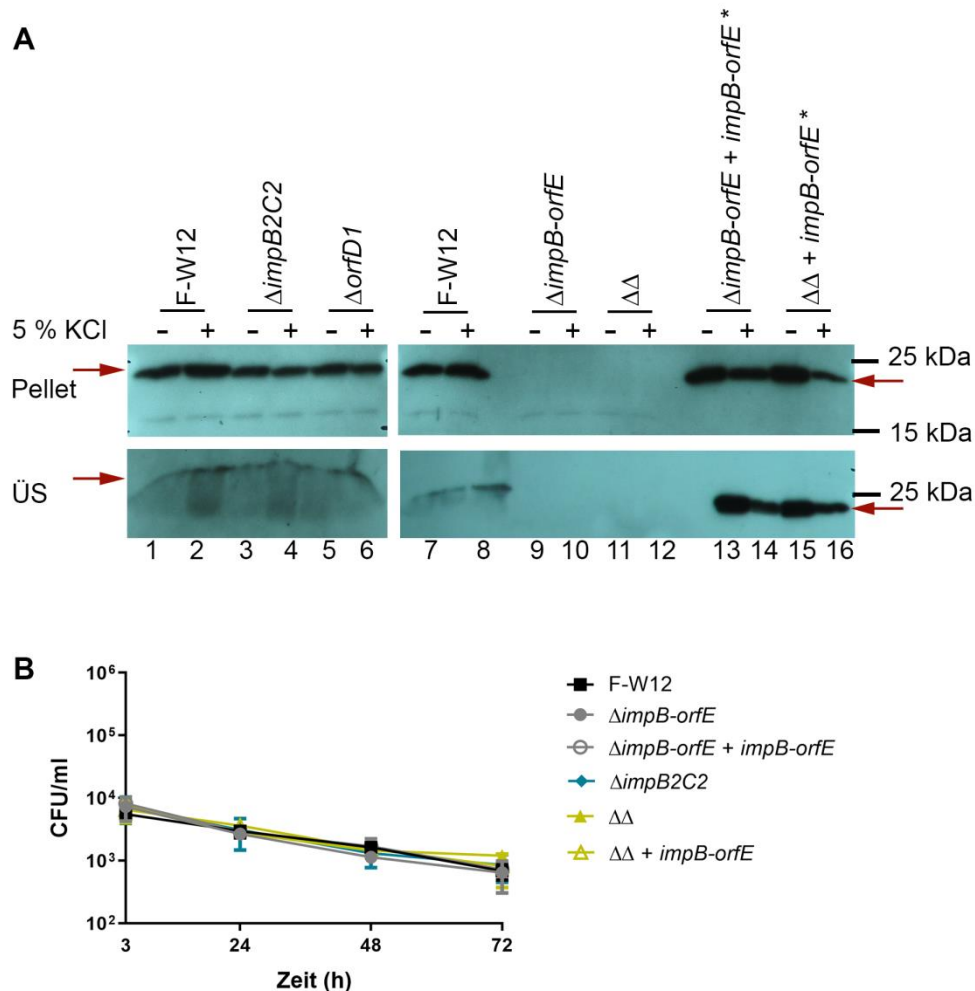


Abb. 16: Analysen zu OrfE (IglCW₁₂) in F-W12. A: Die F-W12 Stämme wurden für 24 h in Medium T mit (+) bzw. ohne (-) 5 % Kaliumchlorid (KCl) kultiviert. Aufgetragen wurden gleiche Mengen des Ganzzelllysats (OD₆₀₀ = 1, Pellet, oberer Streifen) und des filtrierten, gefällten Kulturüberstandes (ÜS, unterer Streifen). Das OrfE-Protein (durch rote Pfeile markiert) besitzt eine Größe von etwa 23 kDa und konnte mittels des OrfE-Antikörpers (1:100) detektiert werden. **B:** Die J774 Zellen wurden für 2 h mit den F-W12 Stämmen und einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch die Zugabe von Saponin lysiert und die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils technischen Duplikaten. **F-W12:** F-W12 Wildtyp, **$\Delta impB2C2$:** F-W12 $\Delta impB2C2$ Mutante, **$\Delta orfD1$:** F-W12 $\Delta orfD1$ Mutante, **$\Delta impB-orfE$:** F-W12 $\Delta impB-orfE$ Mutante, **$\Delta\Delta$:** F-W12 $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$ Doppelmutante, **$\Delta impB-orfE + impB-orfE$:** F-W12 $\Delta impB-orfE$ Mutante mit FIV2-*impB-orfE*, **$\Delta\Delta + impB-orfE$:** F-W12 $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$ Doppelmutante mit FIV2-*impB-orfE*; * Proben 1:10 verdünnt.

1.2.3.3. OrfE (IglCW₁₂) in *Fth* LVS und *Fno* U112

Wie oben erwähnt, besitzt das OrfE (IglCW₁₂) Protein von F-W12 eine Proteinidentität von 14 % zum IglC von *Fno* U112 (FTN_1322) bzw. *Fth* LVS (FTL_0113) und zum alternativen „IglC“ (FTN_0044) von *Fno* U112 eine Identität von 77 %. Aufgrund der relativ großen Identität zwischen FTN_0044 und OrfE sollte geprüft werden, ob das zur Antikörperherstellung verwendete Peptidantigen eine eventuelle Kreuzdetektion von

FTN_0044 zulässt. Dazu wurden die Proteinsequenzen von FTL_0113, FTN_0044, OrfE und des Antigens verglichen (siehe Abb. 17) und es wird erkennbar, dass sich das OrfE bzw. das Peptidantigen und das FTN_0044 nur in zwei Aminosäuren unterscheiden: S217G und S220T. Daher wäre eine Kreuzdetektion des FTN_0044 (alternatives „IglC“) von *Fno* durch den OrfE-Antikörper denkbar. Ferner ist eine Detektion von IglC FTL_0113 (*Fth* LVS) sehr unwahrscheinlich, da in diesem Fall nur vier Aminosäuren identisch sind.

	200	210	220	230
Antigen	-----	EKGTPISTWTSDSSQKIV--VG	-----	
OrfE	IIS	GKWEKGTPISTWTSDSSQKIV--VG	VD	SGK-
FTN_0044	VVT	GKWEKGTPISTWT	GDSTQKIV--VG	VDAGGK
FTL_0113	SIDGLTTSQGS	LPVCCAA	STD	KGVAKIGYIAAA-

Abb. 17: Sequenzvergleich des Peptidantigens, OrfE, FTN_0044 und FTL_0113. Dargestellt sind das Peptidantigen für die anti-OrfE Antikörperherstellung (Antigen) und Ausschnitte der Aminosäuresequenzen des IglC von *Fth* LVS (FTL_0113) und der IglC-ähnlichen Proteine von *Fno* U112 (FTN_0044) und F-W12 (OrfE). In Rot sind die homologen und in Schwarz die nicht-homologen Aminosäuren abgebildet.

Zur Detektion von OrfE (IglC_{W12}) in den *trans*-Komplementanten von *Fth* LVS und *Fno* U112 wurden die Bakterien wie oben beschrieben kultiviert, aufbereitet und für Immunoblot Analysen verwendet. Auch hier wurde das Zelllysate getrennt vom ÜS untersucht, um eine eventuelle Sekretion des OrfE-Proteins feststellen zu können. Der verwendete OrfE Antikörper resultierte in zwei Banden in den Western Blot Analysen (siehe Abb. 18). Die eine Bande befand sich auf der Höhe von etwa 50 kDa und war in allen Proben des Zelllysates von *Fth* und *Fno* erkennbar, wobei in den *Fth* LVS und *Fth* LVS Δ iglC Proben eine größere Intensität festzustellen war (Abb. 18 A, Spur 1 - 4, oberer Streifen). Bei den 50 kDa Banden handelte es sich jedoch um Kreuzreaktionen des Antikörpers, da erst die *trans*-Komplementation der *Fth* LVS Δ iglC Mutante mit den Genen *impB-orfE* zu einer Detektion einer 23 kDa großen Bande führte (Abb. 18 A, Spur 5, 6, oberer Streifen), welche der Größe von OrfE entspricht.

Wie erwartet, führte der OrfE Antikörper zur Detektion des alternativen „IglC“ (FTN_0044) im Zelllysate der *Fno* Proben. Das wurde durch die Detektion einer 23 kDa Bande im Wildtyp *Fno* U112 und der U112 Δ iglC Mutante deutlich (Abb. 18 A, Spur 7 – 10, oberer Streifen). Die *trans* Komplementation von U112 Δ iglC mit FIV2-*impB-orfE* resultierte jedoch in einer Bande mit einer etwas stärkeren Intensität (im Vergleich zum Wildtyp U112; Abb. 18 A, Spur 11, 12, oberer Streifen). Folglich konnte auch hier das OrfE Protein nachgewiesen werden.

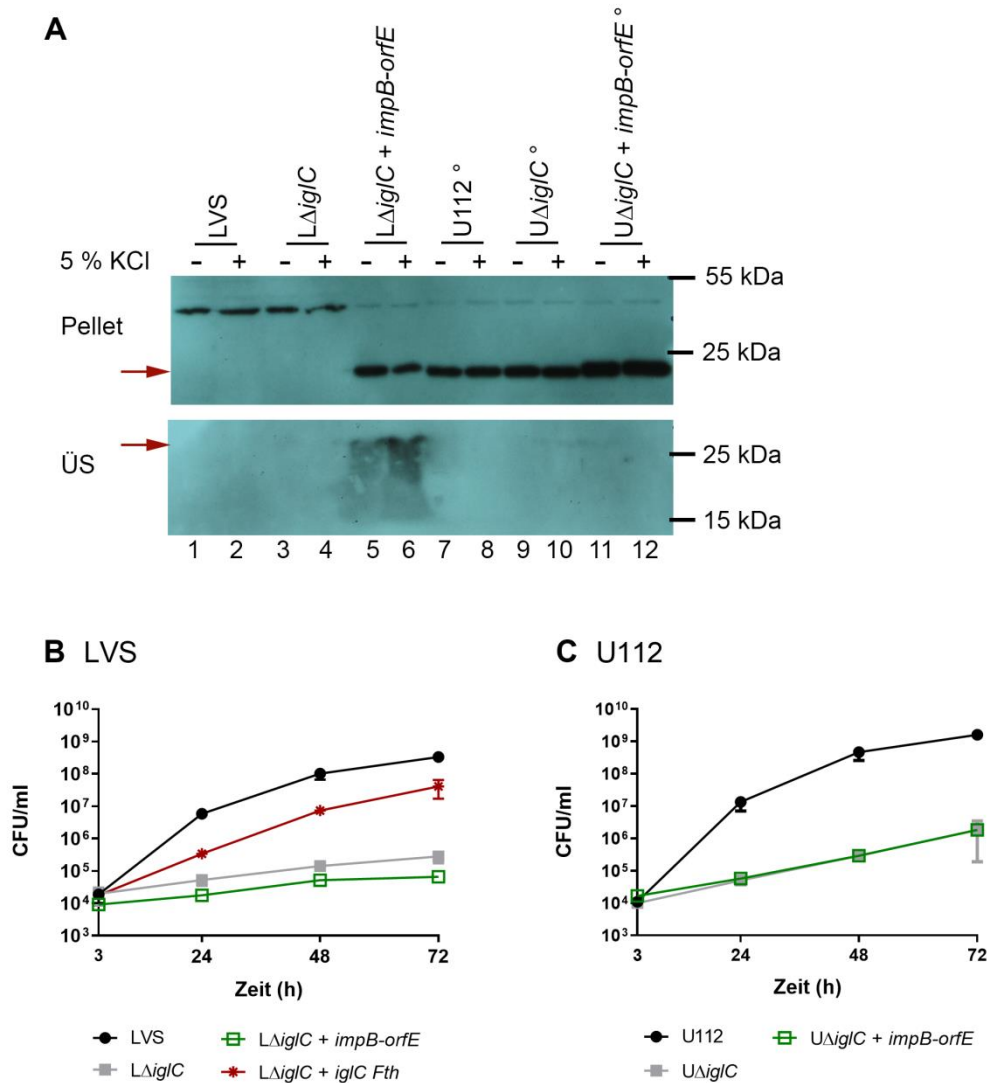


Abb. 18: Analysen zu OrfE (IglC_{W12}) in *Fth* LVS und *Fno* U112. **A:** Die *Fth* LVS und *Fno* U112 Stämme wurden für 24 h in Medium T mit (+) bzw. ohne (-) 5 % Kaliumchlorid (KCl) kultiviert. Aufgetragen wurden gleiche Mengen des Ganzzelllysats (OD₆₀₀ = 1, Pellet, oberer Streifen) und des filtrierten, gefällten Kulturüberstandes (ÜS, unterer Streifen). Das OrfE-Protein (durch rote Pfeile markiert) besitzt eine Größe von etwa 23 kDa und konnte mittels des OrfE-Antikörpers (1:100) in den Proben nachgewiesen werden. **B – C:** Die U937 Zellen wurden für 2 h mit den *Fth* und *Fno* Stämmen und einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch die Zugabe von Saponin lysiert und die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils technischen Duplikaten. **LVS:** *Fth* LVS, **L Δ iglC:** *Fth* LVS Δ iglC Mutante, **L Δ iglC + *impB-orfE*:** *Fth* LVS Δ iglC Mutante mit FIV2-*impB-orfE*, **L Δ iglC + *iglC Fth*:** *Fth* LVS Δ iglC Mutante mit FIV2-*iglC Fth*; **U112:** *Fno* U112, **U Δ iglC:** *Fno* U112 Δ iglC Mutante, **U Δ iglC + *impB-orfE*:** *Fno* U112 Δ iglC Mutante mit FIV2-*impB-orfE*, °: Zelllysate 1:10 verdünnt

Im ÜS war das OrfE Protein in den Proben der LVS Δ iglC FIV2-*impB-orfE* Komplementante deutlich zu finden (Abb. 18 A, Spur 5, 6, unterer Streifen). Hier schien die Zugabe von KCl im Medium die Sekretion von OrfE leicht zu erhöhen, was durch eine etwas stärkere Bande deutlich wird (vergleiche Spur 5 vs. 6). Ob auch eine Sekretion von FTN_0044 bzw. OrfE in

Fno stattfand, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, da keine bzw. eine nur sehr schwache Bande in den Proben des ÜS sichtbar ist (Abb. 18 A, Spur 7 - 12, unterer Streifen). Nachdem die Expression und die Sekretion von OrfE in den Transformanten von *Fth* LVS und *Fno* U112 untersucht wurden, sollte nun deren Auswirkungen auf das intrazelluläre Verhalten der \DeltaiglC Mutanten im Infektionsmodell mit der Zelllinie U937 untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI von 10 für 2 h mit den Bakterien (LVS, LVS \DeltaiglC , LVS \DeltaiglC FIV2-*impB-orfE*, U112, U112 \DeltaiglC , U112 \DeltaiglC FIV2-*impB-orfE*) infiziert, anschließend mit Gentamicin behandelt und für maximal 72 h kultiviert. Zu den Zeitpunkten 3 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen durch die Zugabe von Saponin lysiert und auf Nährböden ausplattiert. Die Anzahl der kultivierbaren Bakterien sind als CFU/ml in Abb. 18 B dargestellt. Als Positivkontrolle wurde eine bereits von uns publizierte Komplementante von *Fth* LVS \DeltaiglC mit FIV2-*iglC* (*Fth*) verwendet [214]. Es wird deutlich, dass die Komplementation mit FIV2-*impB-orfE* nicht den intrazellulären Replikationsdefekt der \DeltaiglC Mutanten komplementiert weder in *Fth* LVS \DeltaiglC noch in *Fno* U112 \DeltaiglC . Die Kurvenverläufe entsprechen in etwa denen der \DeltaiglC Mutanten (siehe Abb. 18 B).

1.2.3.4. Analysen zu OrfD1-Myc (VgrG_{W12}) in F-W12

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem OrfD1 des F-W12 Stammes um ein alternatives VgrG Protein handeln könnte, sollte zunächst geklärt werden, ob das Protein exprimiert und sekretiert wird. Da kein funktionierender Antikörper zur spezifischen Detektion von OrfD1 hergestellt werden konnte (siehe III.1.2.3.1), wurde das OrfD1 mit einem Myc-tag versehen (Peptidsequenz EQKLISEEDL, siehe II.2.3.1). Dazu wurde das Fusionskonstrukt (*orfD1-Myc*) in den pFIV2-Val Vektor kloniert und in den Wildtyp F-W12 sowie dessen Mutanten ($\Delta impB-orfE$, $\Delta impB2C2$, $\Delta impB-orfE\Delta impB2C2$, $\Delta orfD1$) transformiert. Die Stämme wurden anschließend im Medium mit bzw. ohne KCl kultiviert und für Immunoblot-Untersuchungen gesammelt. Dazu wurden die Kulturproben pelletiert sowie der erhaltene ÜS filtriert und gefällt. Für die Detektion von OrfD1-Myc wurden die Proben (gleiche Mengen) mit SDS und Hitze denaturiert, im SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt, mithilfe des Western Blot auf eine Membran übertragen und durch die Verwendung des primären c-Myc-Antikörpers (1:1000) und des sekundären α -Maus-Antikörpers (1:1000) sichtbar gemacht (siehe II.2.16). Dadurch, dass das OrfD1 mit einem Myc-tag versehen wurde, besitzt es nun eine erwartete Größe von etwa 11 kDa (OrfD1 10 kDa und Myc-tag 1 kDa). Wie in Abb. 19 A zu sehen ist, wurde das OrfD1-Myc nur in den Komplementationsstämmen nachgewiesen (Spur 7 - 12, 19 - 24, oberer Streifen). Die Banden der ÜS-Proben wurden zwischen 10 kDa

und 25 kDa detektiert, da aber die mitgeführten Kontrollstämme (ohne Komplementationskonstrukt) nicht die entsprechenden Banden aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass hier spezifisch das OrfD1 nachgewiesen werden konnte (Abb. 19 A; Spur 1 – 6, 13 – 18). Durch die Zugabe von KCl im Kulturmedium schien die Menge des im Pellet nachgewiesenen OrfD1-Myc reduziert zu sein (siehe Abb. 19 A, vergleiche Spur 7 vs. 8, 9 vs. 10, 11 vs. 12, 19 vs. 20, 21 vs. 22, 23 vs. 24, oberer Streifen). Da etwa gleiche Mengen an OrfD1-Myc im Wildtypen F-W12 und in den Deletionsmutanten ($\Delta impB-orfE$, $\Delta impB2C2$, $\Delta impB-orfE\Delta impB2C2$) nachgewiesen wurde (im Pellet und im ÜS), scheint die Expression und Sekretion nicht von den anderen putativen T6SS-Komponenten von F-W12 abzuhängen.

Auch die Deletion von *vgrG* führt in *Fth* LVS zum intrazellulären Replikationsdefekt [171]. Zwar wurde noch keine Wirtszelle für den F-W12 Stamm gefunden, dennoch sollte eine mögliche Beeinflussung des intrazellulären Verhaltens durch die Deletion von *orfD1* im Infektionsmodell untersucht werden. Dazu wurden Infektionsversuche mit dem Wildtyp F-W12, der Deletionsmutante $\Delta orfD1$ und der Komplementante $\Delta orfD1 + pFIV2-orfD1-Myc$ in der Mausmakrophagenzelllinie J774 durchgeführt (siehe Abb. 19 B). Die $\Delta orfD1$ Mutante des F-W12 zeigte kein verändertes Verhalten in der Infektion. Sie persistierte wie der Wildtyp relativ konstant über den gesamten Zeitraum der Infektion. Ähnliches wurde auch für die Komplementante beobachtet. Zur Prüfung, ob die Myc-Fusion einen Einfluss hat, wurde die $\Delta orfD1$ Mutante mit FIV2-*orfD1* komplementiert und im Infektionsmodell getestet. Auch hier veränderte sich das intrazelluläre Verhalten nicht (siehe Abb. 19 B).

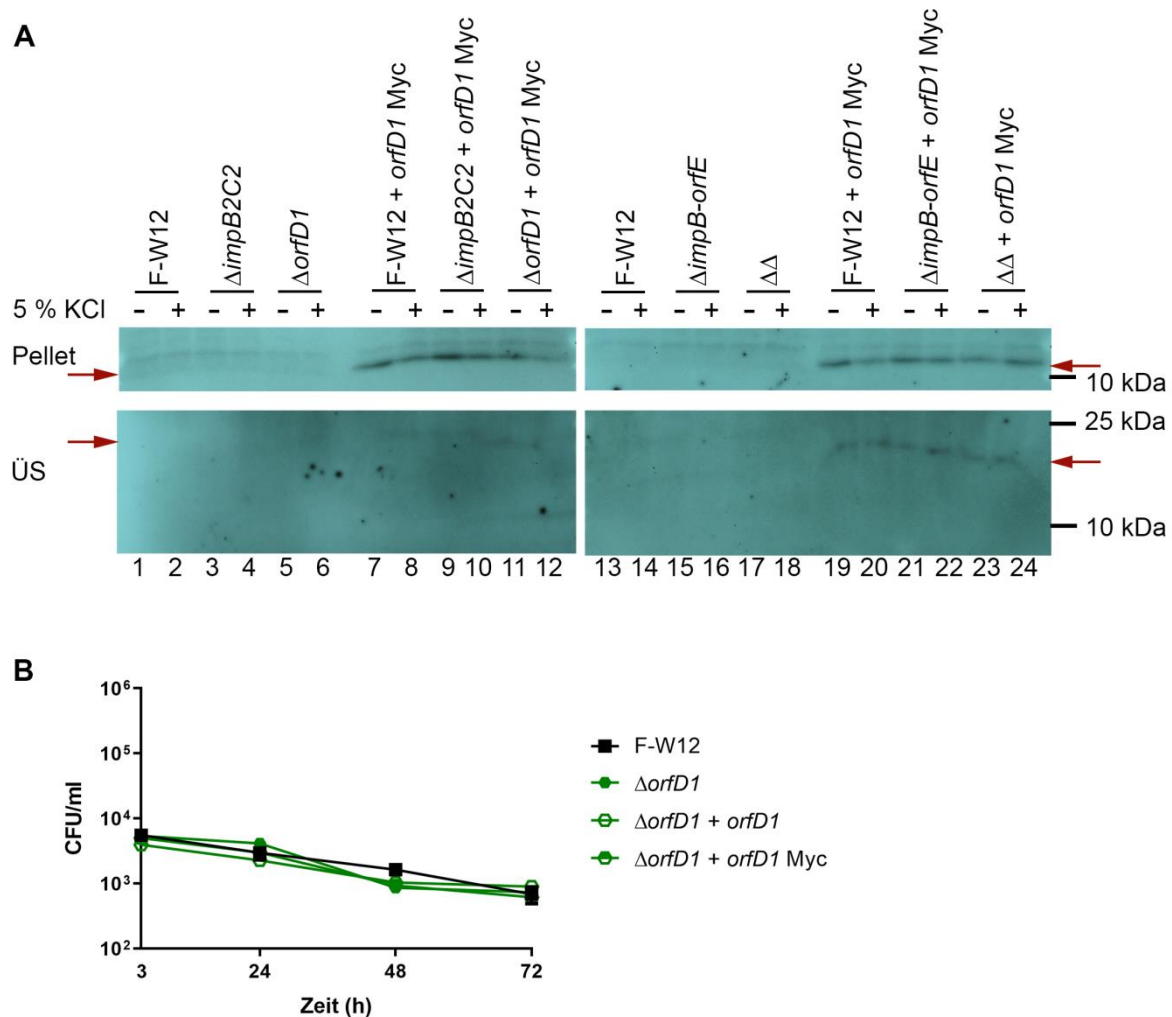


Abb. 19: Analysen zu OrfD1-Myc (VgrG_{W12}) in F-W12. **A:** Die F-W12 Stämme wurden für 24 h in Medium T mit (+) bzw. ohne (–) 5 % Kaliumchlorid (KCl) kultiviert. Aufgetragen wurden gleiche Mengen des Ganzzelllysats (OD₆₀₀ = 1, Pellet, oberer Streifen) und des filtrierten, gefällten Kulturüberstandes (ÜS, unterer Streifen). Das Fusionsprotein OrdD1-Myc (durch rote Pfeile markiert) besitzt eine Größe von etwa 11 kDa und wurde mittels eines c-Myc-Antikörpers (1:1000) in den Proben nachgewiesen. **B:** Die J774 Zellen wurden für 2 h mit den F-W12 Stämmen und einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch die Zugabe von Saponin lysiert und die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils technischen Duplikaten. **F-W12:** F-W12 Wildtyp, **$\Delta impB2C2$:** F-W12 $\Delta impB2C2$ Mutante, **$\Delta orfD1$:** F-W12 $\Delta orfD1$ Mutante, **F-W12 + $orfD1$ Myc:** F-W12 Wildtyp mit FIV2- $orfD1$ Myc, **$\Delta impB2C2$ + $orfD1$ Myc:** F-W12 $\Delta impB2C2$ Mutante mit FIV2- $orfD1$ Myc, **$\Delta orfD1$ + $orfD1$ Myc:** F-W12 $\Delta orfD1$ Mutante mit FIV2- $orfD1$ Myc, **$\Delta impB-orfE$:** F-W12 $\Delta impB-orfE$ Mutante, **$\Delta\Delta$:** F-W12 $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$ Doppelmutante, **$\Delta impB-orfE$ + $orfD1$ Myc:** F-W12 $\Delta impB-orfE$ Mutante mit FIV2- $orfD1$ Myc, **$\Delta\Delta$ + $orfD1$ Myc:** F W12 $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$ Doppelmutante mit FIV2- $orfD1$ Myc.

1.2.3.5. OrfD1-Myc (VgrG_{W12}) in *Fth* LVS

Als nächstes sollte versucht werden die LVS $\Delta vgrG$ Mutante mit dem VgrG_{W12} (FIV2- $orfD1$ -Myc) zu komplementieren. Dazu wurde ebenso das Fusionskonstrukt $orfD1$ -Myc wie zur Komplementierung der F-W12 Stämme verwendet (siehe oben). Bereits bei der Klonierung in

E. coli fiel auf, dass die *E. coli* pFIV2-*orfD1* Myc Klone schlecht kultivierbar waren und später bei den *Fth* LVS Δ *vgrG* FIV2-*orfD1* Myc Komplementanten waren zwei distinkte Kolonie-Phänotypen (grau und weiß) zu beobachten. *Fth* LVS bildet auf MTKH-Nährböden weiß-gelbliche Kolonien und die Kolonien von F-W12 sind eher grau-blau. Von den *Fth* LVS Δ *vgrG* FIV2-*orfD1* Myc Komplementen wurden jeweils graue und weiße Klone ausgewählt und mithilfe der PCR auf das Vorhandensein des FIV-*orfD1* Myc Konstruktes untersucht. Hierbei waren keine Unterschiede festzustellen, ebenso zeigten die Komplementanten kein reduziertes *in vitro* Wachstum in Vollmedium (siehe Anhang Tab. 27). Bevor die Komplementanten im Infektionsmodell getestet wurden, sollte überprüft werden, ob das Protein OrfD1-Myc in den *Fth* LVS Δ *vgrG* FIV2-*orfD1* Myc Transformanten exprimiert und sekretiert wird. Dazu wurden der Wildtyp *Fth* LVS, die *Fth* LVS Δ *vgrG* Mutante und die Komplementanten (jeweils ein weiß und ein grauer Klon) in Medium mit bzw. ohne 5 % KCl kultiviert. Auch hier wurde der Kulturüberstand getrennt vom Bakterienpellet untersucht. Wie in Abb. 20 A erkennbar ist, war das OrfD1-Myc nur in dem grauen LVS Δ *vgrG* + FIV2-*orfD1*-Myc Klon 1 im Bakterienpellet nachweisbar (Abb. 20 A, Spur 5, 6). Im weißen Klon (Klon 2) konnte weder im Zellpellet noch im ÜS OrfD1-Myc nachgewiesen werden. Als nächstes sollte geprüft werden, ob das OrfD1 (*VgrG*_{W12}) den Replikationsdefekt der LVS Δ *vgrG* Mutante ausgleichen kann. Dazu wurden Infektionsversuche mit der Mausmakrophagenzelllinie J774 und *Fth* LVS, *Fth* LVS Δ *vgrG* und LVS Δ *vgrG* + FIV2-*orfD1*-Myc Transformanten (jeweils ein weißer und ein grauer Klon) sowie LVS Δ *vgrG* + FIV2-*orfD1* Transformanten (jeweils ein grauer und ein weißer Klon, *orfD1* ohne Myc-tag) durchgeführt. Wie in Abb. 20 B dargestellt, konnte der Replikationsdefekt der LVS Δ *vgrG* nicht mit OrfD1 komplementiert werden. Im Gegensatz, der Klon 1 (graue Kolonie) zeigte ein leicht reduziertes Wachstum als die LVS Δ *vgrG* Mutante. Hier konnten weniger kultivierbare Bakterien nachgewiesen werden als in der LVS Δ *vgrG* Mutante und bei Klon 2 (weiße Kolonie). Dieser Effekt war unabhängig vom Myc-Tag des Proteins (siehe Abb. 20 B).

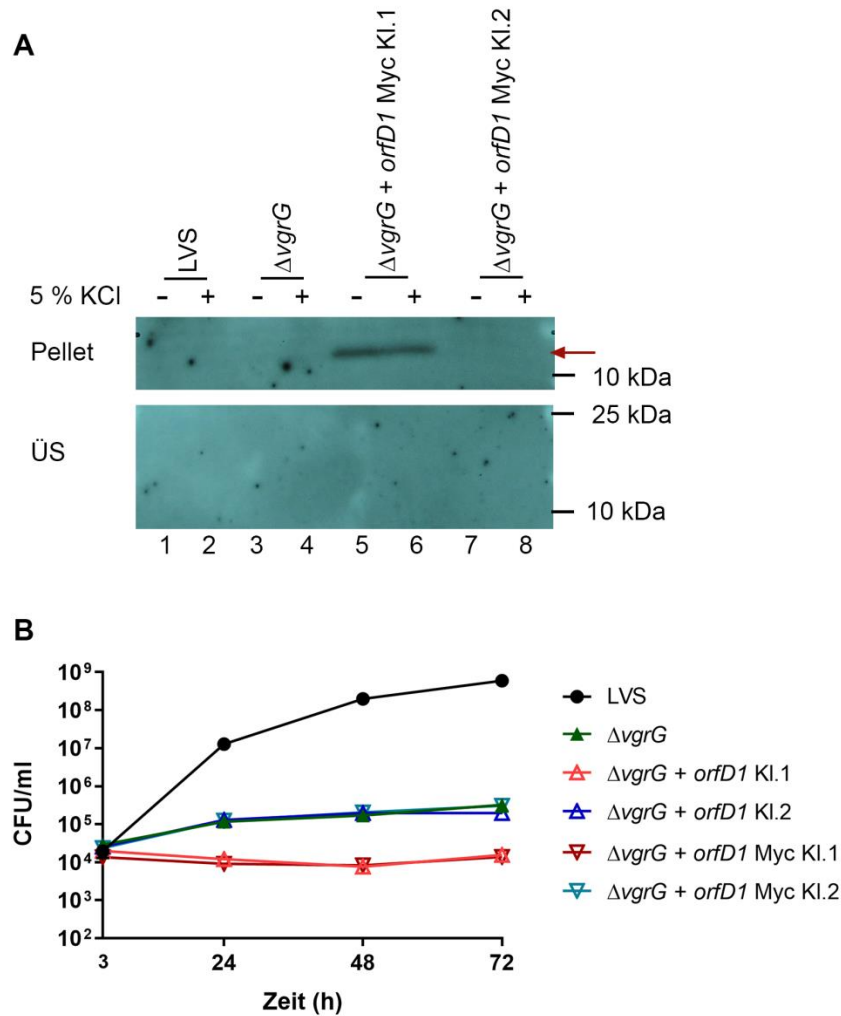


Abb. 20: Analysen zu OrfD1-Myc (VgrG_{w12}) in *Fth* LVS. **A:** Die LVS Stämme wurden für 24 h in Medium T mit (+) bzw. ohne (–) 5 % Kaliumchlorid (KCl) kultiviert. Aufgetragen wurden gleiche Mengen des Ganzzelllysats OD₆₀₀ = 1, Pellet (oberer Streifen) und des filtrierten, gefällten Kulturüberstandes (ÜS, unterer Streifen). Das Fusionsprotein OrfD1-Myc (durch rote Pfeile markiert) besitzt eine Größe von etwa 11 kDa und konnte mittels eines c-Myc-Antikörpers (1:1000) in den Proben nachgewiesen werden. **B:** Die J774 Zellen wurden für 2 h mit den LVS Stämmen und einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch die Zugabe von Saponin lysiert und die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils technischen Duplikaten. **LVS:** *Fth* LVS Wildtyp; **$\Delta vgrG$:** *Fth* LVS $\Delta vgrG$ Mutante; **$\Delta vgrG + orfD1$ Kl.1:** *Fth* LVS $\Delta vgrG$ Mutante mit FIV2-*orfD1* Klon 1, graue Kolonie; **$\Delta vgrG + orfD1$ Kl.2:** *Fth* LVS $\Delta vgrG$ Mutante mit FIV2-*orfD1* Klon 2, weiße Kolonie; **$\Delta vgrG + orfD1$ Myc Kl.1:** *Fth* LVS $\Delta vgrG$ Mutante mit FIV2-*orfD1* Myc Klon 1, graue Kolonie; **$\Delta vgrG + orfD1$ Myc Kl.2:** *Fth* LVS $\Delta vgrG$ Mutante mit FIV2-*orfD1* Myc Klon 2, weiße Kolonie.

1.2.3.6. OrfD1-Multimerbildung

Für das *Francisella* VgrG Protein konnte bereits eine Bildung von VgrG-Multimeren gezeigt werden [171]. Um zu überprüfen, ob das OrfD1 (VgrG_{W12}) im F-W12 FIV2-*orfD1*-Myc und in den *Fth* LVS Δ *vgrG* FIV2-*orfD1*-Myc Transformanten ebenfalls Multimere bilden kann, wurden die Kulturlysate (ohne KCl) für eine Western Blot Analyse genutzt. Zur Aufrechterhaltung der Proteinkomplexe und Sekundärstrukturen wurden die Proben vergleichend zur normalen Behandlung (reduzierender Ladepuffer RotiLoad 1 und Denaturierung bei 100 °C, Abb. 21 Ansatz C, Spur 3, 6) ohne Denaturierung (Abb. 21 Ansatz B, Spur 2, 5), bzw. mit einem nicht-reduzierenden Ladepuffer und ohne Denaturierung, verwendet (RotiLoad 2, Abb. 21 Ansatz A, Spur 1, 4). Das OrfD1-Myc Monomer besitzt eine Größe von etwa 11 kDa und konnte in allen F-W12 und LVS Δ *vgrG* Proben nachgewiesen werden (Abb. 21 Spur 1 - 6). Zusätzlich dazu konnten in den F-W12 FIV2-*orfD1*-Myc Proben weitere Banden festgestellt werden, u.a. der Größe von etwa 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, wenn kein Denaturierungsschritt erfolgte (Abb. 21 Spur 1, 2). Bei der Verwendung des nicht-reduzierenden Ladepuffers war die Bandenintensität der 20 kDa Bande am intensivsten (Abb. 21 Spur 1). Im Gegensatz dazu führte die gleiche Behandlung in der LVS Δ *vgrG* FIV2-*orfD1*-Myc Probe nur zu einer sehr schwachen 20 kDa großen Bande. Dennoch waren auch hier viele Banden (\geq 40 kDa) sichtbar (Abb. 21 Spur 4, 5).

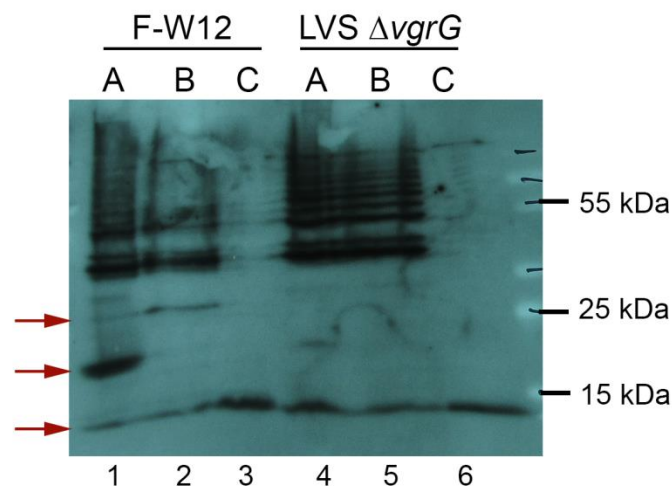


Abb. 21: Multimerbildung von OrfD1-Myc (VgrG_{W12}) in F-W12 und LVS Δ *vgrG*. Die Stämme F-W12 FIV2-*orfD1*-Myc und *Fth* LVS Δ *vgrG* FIV2-*orfD1*-Myc wurden für 24 h in Medium T ohne Kaliumchlorid kultiviert. Aufgetragen wurden gleiche Mengen des Ganzzelllysats. Für die Ansätze **A** wurden die Proben mit dem nicht-reduzierenden Probenpuffer RotiLoad 2 versetzt, für **B** + **C** mit dem reduzierenden Probenpuffer RotiLoad 1 versetzt. Nur die Proben des **C**-Ansatzes wurden anschließend einer Denaturierung für 10 min bei 100 °C unterzogen. Die roten Pfeile markieren die Höhe der OrfD1 Tri-, Di- und Monomere.

1.2.4. Verbleibt F-W12 im Phagosom?

In Rydzewski et al. konnte bereits das intrazelluläre Vorkommen des F-W12 Stammes in den Mausmakrophagen J774 gezeigt werden, jedoch wurde nicht eindeutig belegt, ob der Stamm sich frei im Zytosol oder in einem Membran-ausgekleideten Phagosom befindet. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte dieser Frage nachgegangen werden [165]. Dazu wurden die J774 Zellen mit F-W12 infiziert und anschließend mit Gentamicin behandelt. Da eine möglichst große Anzahl an infizierten J774 Zellen erzielt werden sollte, wurden die J774 Zellen hier mit einer MOI von 1000 infiziert. Nach 6 h und 24 h der Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und fixiert. Die anschließenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von der RKI-Abteilung „ZBS4 Elektronenmikroskopie“ durchgeführt. Als Kontrollen wurden bei diesem Versuch der Stamm *Fth* LVS und dessen Deletionsmutante *Fth* LVS \DeltaiglC verwendet. Für *Fth* LVS ist dokumentiert, dass dieser bereits nach 6 h frei im Zytosol der Wirtszelle vorliegt [171, 249, 251]. Im Gegensatz dazu kann die *Fth* LVS \DeltaiglC Mutante das Phagosom nicht verlassen und befindet sich demnach weiterhin in einem Membran-umschlossenem Phagosom [171, 249, 251]. In Abb. 22 sind elektronenmikroskopische Bilder der Infektion der J774 Zellen mit F-W12, *Fth* LVS und *Fth* LVS \DeltaiglC nach 6 h und 24 h dargestellt. Die *Fth* LVS Bakterien waren bereits nach 6 h der Infektion nicht mehr von einer vollständigen Phagosommembran umgeben (Abb. 22 oben). Nach 24 h der Infektion sind die J774 Zellen mit einer Vielzahl von *Fth* LVS Bakterien gefüllt, welche ebenfalls frei im Zytosol vorlagen, da keine vollständige Phagosommembran erkennbar war. Im Gegensatz dazu befindet sich die LVS \DeltaiglC Mutante nach 6 h und nach 24 h der Inkubation in einem zumeist vollständigem Membran-ausgekleideten Phagosom (Abb. 22 Mitte). Darüber hinaus war auch keine Zunahme der intrazellulären Bakterien während der Inkubation (24 h) zu verzeichnen. Ein ähnliches Bild konnte für den F-W12 Stamm beobachtet werden. Auch hier befanden sich die F-W12 Bakterien nach 6 h und 24 h der Inkubation in einem Membran-umgebenes Phagosom, ebenso war keine Zunahme der Bakterienzahl erkennbar (Abb. 22 unten).

Als nächstes sollten die Phagosomen bezüglich ihrer Membranvollständigkeit quantifiziert werden. Dazu wurden die Bakterien bzw. Phagosomen in vier Gruppen eingeteilt. I: Bakterien frei im Zytosol (ohne Membran); II: Bakterien in Phagosom mit $\leq 50\%$ Membran erhalten; III: Bakterien mit $> 50\%$ Phagosommembran umgeben; IV: Bakterien von vollständig erhaltener Phagosommembran umgeben ($> 90\%$). Anhand dieser Parameter wurden insgesamt jeweils 75 *Fth* LVS, *Fth* LVS \DeltaiglC und F-W12 Bakterien in Phagosomen nach einer 24 h Infektion untersucht (Tab. 22).

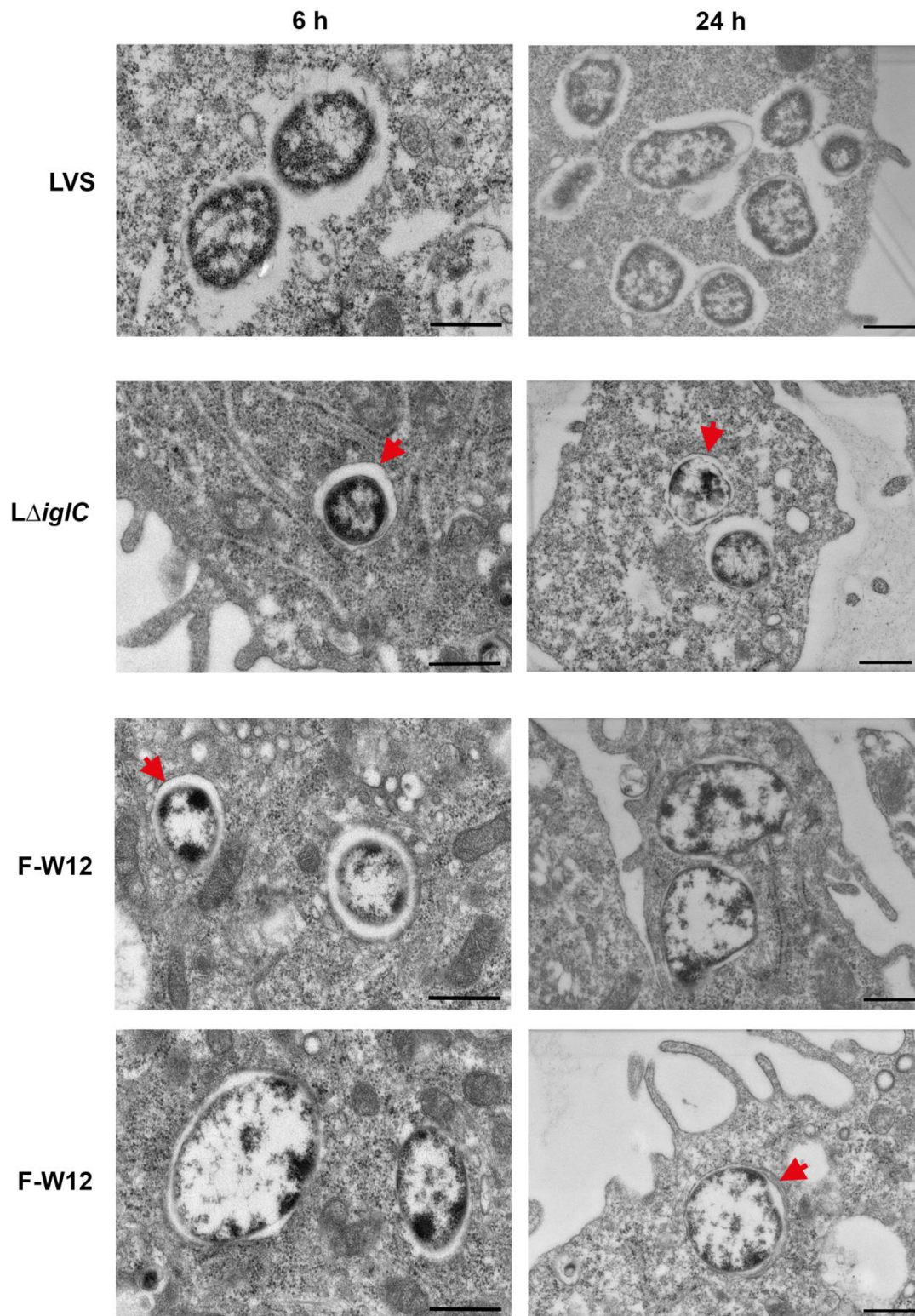


Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von J774 Zellen infiziert mit *Fth* LVS (LVS, 1. Reihe), *Fth* LVS \DeltaiglC (*LΔiglC*, 2. Reihen) bzw. F-W12 (3. und 4. Reihe) nach 6 h (links) und nach 24 h (rechts). Die J774 Zellen wurden mit einer MOI von 1000 (LVS MOI = 10) für 2 h infiziert, für 1 h mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin behandelt und nach 6 h bzw. 24 h fixiert. Die Bilder wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop und STEM-Detektor (6 h) bzw. am Transmissionselektronenmikroskop mit SSCCD Kamera (24 h) aufgenommen. Maßstabsbalken entsprechen 500 μm und die roten Pfeile markieren die Phagosommamembran.

Die deutliche Mehrheit (95 %) der *Fth* LVS Bakterien wurde ohne Membran bzw. mit weniger als 50 % Membran umgeben vorgefunden (Tab. 22). Im Gegensatz dazu waren *Fth* LVS \DeltaiglC und F-W12 vorrangig mit mehr als 50 % Membran bzw. von einer fast vollständig-erhaltenen Membran umgeben (*Fth* LVS \DeltaiglC : 60 %; F-W12: 63 %). Anhand dieser Daten kann vermutet werden, dass der F-W12 sich in einem Phagosom befindet und nicht frei im Zytosol der J774 vorliegt. Demnach verhält er sich wie eine natürliche T6SS-Deletionsmutante, da deutliche Parallelen zu *Fth* LVS \DeltaiglC bestehen (siehe Abb. 22 und Tab. 22). Ebenso zeigte die Doppeldeletionsmutante des F-W12 Stammes keinen Unterschied in Bezug auf das Vorhandensein einer Membran (Daten nicht gezeigt).

Tab. 22: Untersuchungen zur Phagosommembran. Die J774 Zellen wurden für 2 h mit den Bakterien (LVS, LVS \DeltaiglC , F-W12) infiziert, 1 h mit Gentamicin behandelt und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein der Phagosommembran quantifiziert.

Stamm	ohne Membran	≤ 50 % Membran	> 50 % Membran	Membran komplett (≥ 90 %)
LVS	57	14	4	0
L \DeltaiglC	4	26	34	11
F-W12	8	20	31	16

1.3. Suche nach Fitness- und Virulenzfaktoren („Scatterscreen“)

Für den F-W12 konnte zwar bis dato noch keine Wirtszelle gefunden werden (siehe vorne), dennoch zeigten *in silico* Analysen, dass im Genom von F-W12 putative Virulenzfaktoren, wie z.B. MglA („Macrophage growth locus protein“) und Chitinasen, zu finden sind [165]. Für die Identifikation weiterer Virulenz-, Kolonisations- oder allgemeiner Fitnessfaktoren sollte ein Hochdurchsatzverfahren analog zum „Scatterscreen“ von *Legionella pneumophila* entwickelt werden [232, 233]. Der Test beruht auf das Auftreten des sogenannten Scatterphänotyps, welcher erstmals bei der avirulenten *L. pneumophila* $\Delta patA$ Mutante beobachtet wurde. Diese bildete auf Nährböden eine charakteristische Koloniemorphologie aus, die nur in Zusammenhang mit gleichzeitiger Anwesenheit von *A. castellanii* auftrat. Die Kolonien wurden von einem rau, mattglänzenden Ring umgeben und mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde festgestellt, dass die *L. pneumophila* $\Delta patA$ Bakterienkolonien vom Rand ausgehend von den Amöben phagozytiert wurden, daher werden sie als amöbensensitiv bezeichnet. Im Gegensatz dazu ist der Wildtyp *L. pneumophila*

amöbenresistent und bildet keinen Scatterphänotyp aus. Aurass et al. nutzte dieses Phänomen um in einem Hochdurchsatzverfahren innerhalb einer Tn5-Mutantenbank von *L. pneumophila* neue Virulenzfaktoren zu identifizieren [232, 233]. Für *Francisella* wurde ein derartiger Hochdurchsatztest zur Identifizierung von Kolonisations- und Virulenzfaktoren noch nicht entwickelt, obwohl (zumindest) eine Kokultur mit Amöben beschrieben ist [242-245, 248]. Aus dem Grund sollte der Scatterscreen für den F-W12 Stamm etabliert werden. Dazu musste zunächst eine geeignete Amöbe gefunden werden, gegen die der Wildtyp F-W12 resistent ist, also den Scatterphänotyp nicht ausbildet. Dazu wurde ein Testversuch mit den Amöben *A. lenticulata* 45 und 118 durchgeführt, indem die Amöben und der F-W12 gemischt, auf Nährböden gebracht und bei 37 °C kultiviert wurden, bis Bakterienkolonien sichtbar waren. Anschließend wurden die Platten zu RT (20 - 22 °C), 30 °C und 37 °C transferiert und über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen begutachtet. Der Test ergab, dass selbst nach 25 Tagen bei der Kultivierung bei RT kein Scatterphänotyp des Wildtypen zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Daher wurden RT und 25 °C (als stabilere Varianten für die RT) als Bedingungen für einen Scatterscreen mit einer F-W12 Tn5 Mutantenbank festgelegt.

1.3.1. Scatterscreen mit einer F-W12 Tn5-Insertionsmutantenbank

Nachdem nun eine geeignete Amöbe gefunden und die Bedingungen für eine Scatteranalyse ausgetestet wurden, wurde eine randomisierte Tn5 Mutantenbank des Wildtyp F-W12 hergestellt. Mit dem „EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™“ Kit wurden insgesamt etwa 10.000 F-W12 Tn5-Insertionsmutanten generiert (siehe II.2.8). Der F-W12 Stamm verfügt über etwa 1541 Protein-kodierenden Gene, somit könnte jedes Gen theoretisch 6-mal vom Transposon getroffen worden sein (> 6-fache Abdeckung) [215].

Für den Scatterscreen wurde die Tn5 Mutantenbank mit den Amöben *A. lenticulata* 45 bzw. 118 im Verhältnis von 1:10 gemischt, auf Nährböden ausplattiert und bei 37 °C kultiviert. Nachdem Bakterienkolonien sichtbar waren, wurde die Inkubation bei RT bzw. bei 25 °C fortgesetzt und täglich begutachtet. Parallel zum Scatterscreen mit der Tn5-Mutantenbank wurde auch der Wildtyp dem Testverfahren unterzogen und amöbensensitive Tn5 Klone nur so lange gesichert wie der Wildtyp kein Scatterphänotyp ausbildete. Der Scatterphänotyp der F-W12 Tn5 Mutanten unterschied sich zu dem, der zuvor bei der *L. pneumophila* Δ patA Mutante beobachtet wurde. Anstatt des bei *Legionella* dokumentierten äußeren, mattglänzenden Rings wurde bei den F-W12 Tn5 Mutanten ein heller, innerer Ring oder ein seitliches „Auffressen“ der Bakterienkolonie erkennbar (Abb. 23). Mit fortschreitender Inkubation wurde die gesamte Bakterienkolonie unscheinbar und schien zu verschwinden

(Abb. 23 B). Die amöbensenitiven Klone wurden rechtzeitig von den Amöben isoliert und aufgrund des Auftretens des Scatterphänotyps als Scatterklone bezeichnet [215].

Das erste Auftreten des Scatterphänotyps von Tn5 Klonen wurde nach 10 Tage bei 25 °C beobachtet. Bei der Inkubation bei RT erfolgte das Auftreten des Scatterphänotyps zeitlich verzögert. Es war aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Amöben *A. lenticulata* 45 und 118 erkennbar, hinsichtlich des zeitlichen Auftretens und der Anzahl der gefundenen Scatterklone (Tab. 23, siehe Anhang Tab. 28, [215]). Insgesamt wurden etwa 7000 Tn5-Insertionsmutanten in dem Hochdurchsatzverfahren getestet und es konnten 79 amöbensenitive Klone während der 25-tägigen Inkubation und täglichen Begutachtung gesichert werden.

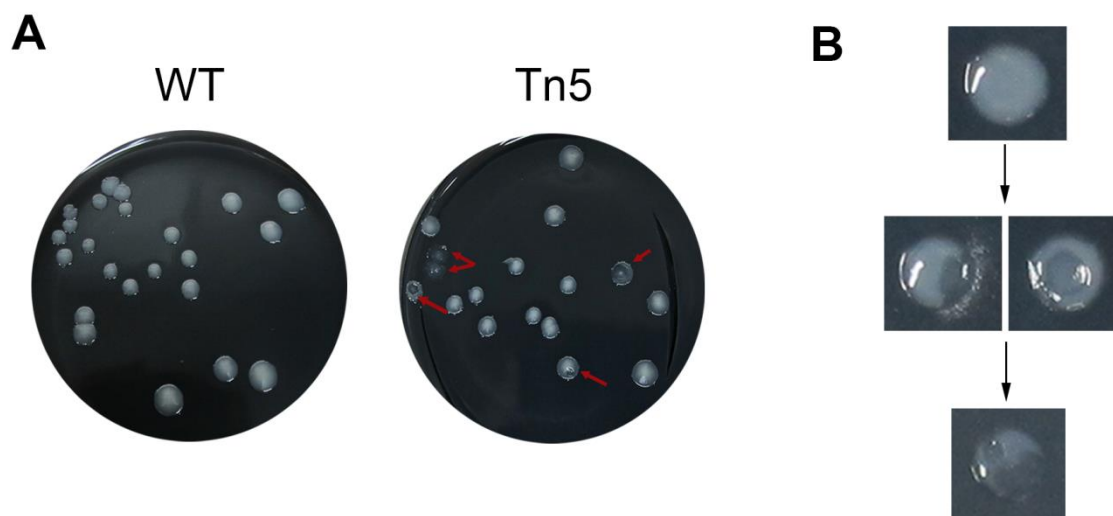


Abb. 23: Ausbildung des Scatterphänotyps. Für den Scatterscreen wurden Amöben (*A. lenticulata* 118 bzw. 45) und Bakterien (F-W12 Wildtyp und F-W12 Tn5 Mutantenbank) gemischt und gemeinsam auf Nährböden ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert bis Bakterienkolonien sichtbar waren. Anschließend wurden sie zu RT (~22 °C), 25 °C und 37 °C transferiert. In **A** sind BCYE-Nährböden mit Amöben und F-W12 Wildtyp (links) bzw. mit F-W12 Tn5 Mutantenbank (rechts) dargestellt. Die roten Pfeile markieren die Scatterkolonien. In diesem Fall wurde die Bakterienkolonie von den mobilen Amöben verdaut. In **B** ist die Ausbildung des Scatterphänotyps dargestellt. Ganz oben befindet sich eine frische intakte Bakterienkolonie. Nach etwa 10 d begannen einige Kolonien von innen oder von der Seite aus zu scattern, also unscheinbar zu werden. Das ist der charakteristische Scatterphänotyp. Ganz unten ist eine fast vollständig gescatterte Kolonie erkennbar. Die Scatterklone wurden rechtzeitig von den Amöben isoliert und gesichert. Verändert nach Einkenkel 2017, Köppen et al. 2019 [215, 252].

1.3.2. Persistenzassay

Um zu überprüfen, ob die gesicherten Scatterklone tatsächlich attenuiert hinsichtlich ihrer Amöbenwiderstandsfähigkeit waren, wurden diese in einem Infektionsversuch weiter analysiert. Da der Wildtyp F-W12 sich nicht in den Amöben repliziert (siehe Abb. 9), jedoch über einen längeren Zeitraum (10 Tage) persistiert, sollte in diesem Fall eher von einem Persistenzassay gesprochen werden. Zunächst sollte der Einfluss der Multiplizität der Infektion (MOI) und der Inkubationszeit im Persistenzassay untersucht werden. Die Amöben *A. lenticulata* 118 wurden mit einer MOI von 10 bzw. 100 für 2 h mit fünf zufällig ausgewählte Scatterklone und dem Wildtyp F-W12 infiziert und anschließend für 1 h mit Gentamicin behandelt (siehe II.2.11.1). Der Persistenztest fand bei 25 °C statt. Für die Bestimmung der kultivierbaren Bakterien wurden nach 3 h, 3 d, 7 d und 10 d die Amöben mechanisch lysiert und die Bakterien auf Nährböden ausplattiert. Die kultivierbaren Bakterien (CFU/ml) wurden mittels des Koloniezählers Acolyte und der dazugehörigen Software ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt [215, 252].

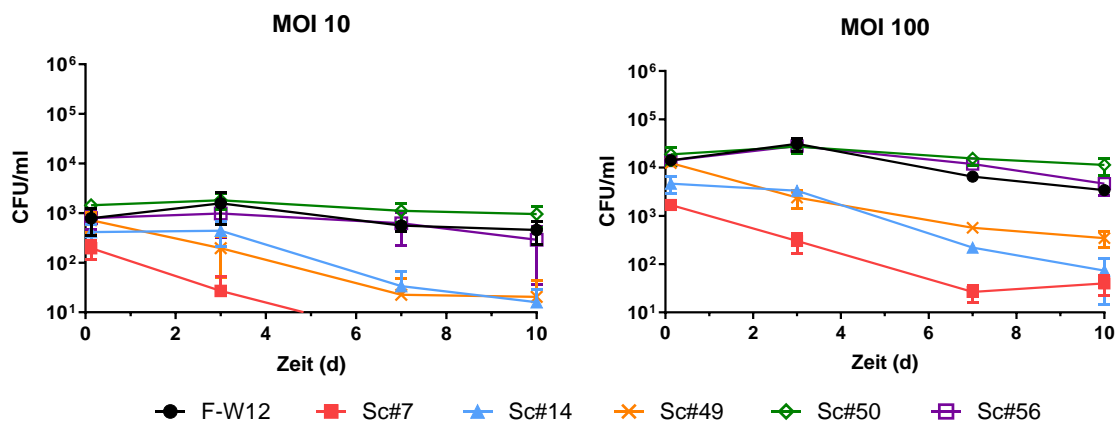


Abb. 24: Etablierung des Persistenzassays von F-W12 und Tn5-Scatterklonen (Sc) in *A. lenticulata* 118. Die *A. lenticulata* 118 wurden für 2 h mit F-W12 und einer MOI von 10 (A) bzw. 100 (B) infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Anzahl der kultivierbaren Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen mit technischen Duplikaten. Verändert nach Einenkel 2017, Köppen et al. 2019 [215, 252].

Wie in Abb. 24 dargestellt ist, vermehrte sich der Wildtyp F-W12 nicht in den *A. lenticulata* 118, jedoch war die Anzahl der kultivierbaren Bakterien (CFU/ml) über den gesamten Zeitraum der Infektion relativ konstant. Beim Wildtyp F-W12 waren bei einer MOI von 10 nach der 2-stündigen Infektion und der 1-stündigen Gentamicin-Behandlung etwa 10³ kultivierbare Bakterien nachzuweisen und nach 7 bzw. 10 Tagen der Inkubation veränderte sich die Anzahl nur geringfügig. Bei einer Erhöhung der MOI auf 100 erhöht sich auch die

Anzahl an kultivierbaren Bakterien zu den jeweiligen Zeitpunkten um den Faktor 10. Bei den Scatterklonen (Sc) #50 und Sc#56 waren ähnliche Kurvenverläufe wie die des Wildtyps F-W12 erkennbar. Im Gegensatz dazu sank die Anzahl der kultivierbaren Bakterien der Sc#7, Sc#14 und Sc#49 im Verlauf der Infektion stark ab, das geschah jedoch unabhängig von der MOI (vgl. Abb. 24 A und B). Da die CFU/ml des Wildtyp F-W12 bei einer MOI von 10 und über einen Zeitraum von 7 Tagen am stabilsten blieb, wurden daher alle nachfolgenden Persistenzassays mit einer MOI von 10 und einer Inkubationsdauer von 7 d durchgeführt.

Nachdem die Bedingungen ausgetestet waren, wurden alle 79 amöbensensitiven Tn5-Klone im Persistenzassay mindestens zweimal getestet [215]. Bei jedem Persistenzassay wurde der Wildtyp F-W12 mitgeführt und dessen „Überlebensrate“ ermittelt. Diese ergab sich aus der Anzahl der kultivierbaren Bakterien an Tag 7 dividiert durch die Anzahl der CFU/ml zum Startzeitpunkt der Infektion (3 h an Tag 0). Das gleiche Verfahren wurde für die Scatterklone angewandt und die erhaltenen Überlebensraten wurden dann im Verhältnis zur Überlebensrate des Wildtyps gesetzt (zur Überlebensrate des F-W12 normiert). Die daraus resultierenden normierten Überlebensraten gaben einen Aufschluss über das Persistenzverhalten des jeweiligen Scatterklons vergleichend zum Wildtyp F-W12. War die normierte Überlebensrate $\leq 0,5$, zeigten diese Klone eine verminderte Persistenz in den *A. lenticulata* 118 (Abb. 24, Abb. 27, Abb. 28; Tab. 23, Anhang Tab. 28, [215]), war sie zwischen 0,5 und 1,5, wiesen diese Scatterklone eine ähnlich stark ausgeprägte Persistenz wie der Wildtyp F-W12 auf, und war sie $\geq 1,5$ wurde von einer leicht erhöhten Persistenz gesprochen. Von den insgesamt 79 gesicherten Scatterklonen zeigte die Mehrheit (43 Klone) eine verminderte Persistenz im Verhältnis zum Wildtyp F-W12 (siehe Anhang Tab. 28). Bei 10 dieser Klone (Sc#2, #7, #14, #16, #17, #19, #20, #37, #39, #49) wurde eine stark verminderte Persistenz festgestellt, was sich durch eine normierte Überlebensrate $\leq 0,1$ ausdrückte. Ein dem Wildtypen-ähnliches Persistenzverhalten (0,5 - 1,5) hatten 31 Scatterklone und 5 amöbensensitive Klone (Sc#33, #36, #44, #50, #60) zeigten eine leicht erhöhte Persistenz im Vergleich zum Wildtyp mit einer normierten Überlebensrate $\geq 1,5$. Generell war es auffällig, dass sich das Persistenzverhalten einiger Scatterklonen mehr oder weniger stark zwischen den einzelnen Persistenzassays unterschied, was durch eine große Standardabweichung bei der ermittelten Überlebensrate zum Ausdruck kam (siehe Anhang Tab. 28).

Tab. 23: Übersicht ausgewählter Scatterklone. Verändert nach Köppen et al. [215].

Sc#	A.I.	Temp.	Überlebensrate		Wachstum nach 24 h (OD ₆₀₀)	Tn5-Insertion		Homolog in <i>Fno</i>	Protein- identität
			A.I. 118	SDS		peg.# ¹	Gen; Funktion		
2	118	RT	0,07 ± 0,07	1,49 ± 0,08	1,28 ± 0,05	631	<i>degT/wbtQ</i> ; LPS Biosynthese	FTN_1430	90,03%
7	118	RT	0,01 ± 0,02	1,59 ± 0,23	1,71 ± 0,11	1522	<i>ftsH</i> [†] ; Zellhunger, -überleben	FTN_0668	88,68%
14	118	RT	0,08 ± 0,08	1,18 ± 0,37	1,57 ± 0,02	413	<i>galU</i> [†] ; LPS/Kapsel-Biosynthese	FTN_0729	87,46%
16	118	RT	0,05 ± 0,04	2,92 ± 0,22	1,30 ± 0,13	413	<i>galU</i> [†] ; LPS/Kapsel-Biosynthese	FTN_0729	87,46%
17	118	RT	0,06 ± 0,1	0,05 ± 0,03	1,81 ± 0,03	1387	<i>mlaA/vacJ</i> [†] ; AM Asymmetrie	FTN_0322	65,52%
19	118	RT	0 ± 0	0,99 ± 0	1,74 ± 0,10	1447	<i>gtrB</i> ; Zellwand-Biosynthese	FTN_1403	82,26%
20	118	RT	0 ± 0	0,06 ± 0,04	1,82 ± 0,03	1387	<i>mlaA/vacJ</i> [†] ; AM Asymmetrie	FTN_0322	65,52%
37	118	RT	0 ± 0	0,29 ± 0,31	1,59 ± 0,21	266	<i>lptE</i> ; LPS Asymmetrie	(FTL_1211)	55,90%
39	45	25°C	0,05 ± 0,06	1,31 ± 0,42	1,71 ± 0,04	249	<i>talA</i> ; Pentose-P Stoffwechsel	FTN_0781	73,21%
49	118	RT	0,09 ± 0,06	1,37 ± 0,47	1,70 ± 0,03	1272	<i>spoT/reIA</i> [†] ; Zellhunger, -überleben	FTN_1518	81,49%
4	118	RT	0,49 ± 0,06		1,86 ± 0,03	1424	Enoyl-CoA Hydratase; FS Metabolismus	FTN_1438	77,72%
21	118	RT	0,12 ± 0,14	0,06 ± 0,01	1,92 ± 0,03	1224	<i>mlaD</i> [†] ; AM Asymmetrie	FTN_0326	77,27%
26	118	RT	0,37 ± 0,39		1,78 ± 0,05	1216	hypothetisches Protein	FTN_0324	50,57%
28	118	RT	0,39 ± 0,24	0,11 ± 0,05	1,79 ± 0,02	1387	<i>mlaA/vacJ</i> [†] ; AM Asymmetrie	FTN_0322	65,52%
30	118	RT	0,32 ± 0,23	0,74 ± 0,33	1,77 ± 0,05	1096	<i>htrB</i> ; Lipid A Biosynthese	FTN_0071	80,78%
32	118	RT	0,19 ± 0,32	0,1 ± 0,05	1,75 ± 0,05	1387	<i>mlaA/vacJ</i> [†] ; AM Asymmetrie	FTN_0322	65,52%
40	45	25°C	0,23 ± 0,1		1,69 ± 0,16	325	GTP-bindendes Protein TypA/BipA	FTN_1157	33,33%
46	45	25°C	0,11 ± 0,16	0,77 ± 0,03	1,68 ± 0,04	266	<i>lptE</i> ; LPS Asymmetrie	(FTL_1211)	55,90%
51	45	25°C	0,21 ± 0,1	0,97 ± 0,11	1,87 ± 0,06	816	Chitinase [†] ; KH Metabolismus	(Fphi_0512)	69,26%
52	45	25°C	0,17 ± 0,03		1,82 ± 0,03	102	Ornithin Cyclodeaminase	FTN_1444	85,80%
62	118	RT	0,19 ± 0,18		1,72 ± 0,03	792	<i>glpD</i> [†] ; Glycerol Metabolismus	FTN_1584	85,46%
65	45	25°C	0,14 ± 0,1	0,11 ± 0,03	1,97 ± 0,01	1387	<i>mlaA/vacJ</i> [†] ; AM Asymmetrie	FTN_0322	65,52%

Sc#	A.I.	Temp.	Überlebensrate		Wachstum nach 24 h (OD ₆₀₀)	Tn5-Insertion		Homolog in <i>Fno</i>	Protein- identität
			A.I. 118	SDS		peg.# ¹	Gen; Funktion		
6	118	RT	0,53 ± 0,43		2,00 ± 0,03	828	Alpha/Beta Hydrolase	FTN_0297	70,75%
22	118	RT	1,28 ± 0,91		1,84 ± 0,01	1091	<i>ppdK</i> [†] ; Gluconeogenese	FTN_0064	91,78%
24	118	RT	0,95 ± 0,94		1,95 ± 0,06	1091	<i>ppdK</i> [†] ; Gluconeogenese	FTN_0064	91,78%
27	118	RT	0,89 ± 0,71		1,96 ± 0,00	1215	<i>yrbC</i> ; nicht-charakterisierter ABC Transporter	FTN_0325	76,92%
54	45	25°C	0,56 ± 0,63		2,02 ± 0,01	766	F-W12 & <i>Allofrancisella</i> spezifisch	-	-
55	45	25°C	1,45 ± 0,91		1,84 ± 0,02	993	<i>cyoB</i> ; Cytochrom O Ubiquinol-Oxidase	FTN_0196	88,26%
56	118	RT	1,38 ± 0,27		1,80 ± 0,01	216	FS Hydroxylase	FTN_0797	51,41%
66	45	25°C	1,2 ± 1,28		1,79 ± 0,03	1469	<i>hemX</i> ; hem Biosynthese	FTN_1372	47,56%
33	118	RT	3,77 ± 2,71		2,01 ± 0,00	228	<i>putA</i> ; Prolin Metabolismus	FTN_1131	84,06%
36	118	RT	1,89 ± 1,58		1,73 ± 0,02	705	<i>higB</i> ; Toxin-Antitoxin System	FTN_1580	25,64%
50	118	RT	1,62 ± 0,56	1,23 ± 0,28	1,77 ± 0,05	721	<i>glk</i> ; Glc Metabolismus	FTN_0462	86,39%
60	118	RT	1,65 ± 1,06		1,82 ± 0,01	1455	Transkriptionsregulator, ArsR Familie	FTN_1393	73,74%

¹ Rydzewski et al. 2014 [165]

[†] bekannter Virulenzfaktor

A.I.: *A. lenticulata*; Temp.: Temperatur; *Fno*: *F. novicida*; AM: Außenmembran; FS: Fettsäure; LPS: Lipopolysaccharide; P: Phosphat; KH: Kohlenhydrat; Glc: Glukose

Überlebensrate in *A. lenticulata* 118: Quotient aus CFU/ml von Tag 7 und Tag 0 der Scatterklone im Verhältnis zum Quotienten des Wildtyps

Farbkodierung basiert auf Überlebensrate in *A. lenticulata* 118 (4. Spalte): Gelb: stark vermindert ($\leq 0,1$); Grün: vermindert ($0,1 - 0,5$); Hellblau: Wildtyp-ähnlich ($0,5 - 1,5$);

Dunkelblau: leicht erhöht ($\geq 1,5$).

1.3.3. Bestimmung der Tn5-Insertionsorte

Von insgesamt 34 Scatterklonen wurden die Insertionsorte des Tn5 Transposons in das Genom von F-W12 mittels inverser PCR bestimmt [215]. Dazu zählten 22 Sc Klone mit einer verminderten Persistenz (davon 10 Sc mit einer stark verminderten), vier Sc Klone mit einer leicht erhöhten sowie acht Sc Klone, die eine vergleichbare Persistenz zum Wildtyp aufwiesen (Tab. 23). Für die Bestimmung der Tn5-Integrationsorte wurde die chromosomale DNA isoliert, mit *HindIII* im Restriktionsverdau geschnitten, mit der T4-DNA Ligase religiert und anschließend gefällt. Die gereinigte DNA wurde in der inversen PCR mit den Primern KAN-2 FP-1 und KAN-2 RP-1 eingesetzt und das erhaltene PCR-Produkt sequenziert und mit Geneious ausgewertet. In Abb. 25 ist die Verteilung der Integrationsorte über das Genom des F-W12 dargestellt. Da es sich beim F-W12-Genom um ein Entwurfsgenom handelt, ist das Chromosom in Contigs unterteilt (überlappenden DNA-Fragmentsequenzen, contiguous) und die potentiellen Gene werden als „protein encoding genes“ (peg.) bezeichnet und durchnummeriert. Es wird deutlich, dass die Tn5-Insertionsorte über das gesamte Genom von F-W12 relativ gleichmäßig, ohne starke Häufung, verteilt zu finden sind. Nur einige Contigs bzw. peg. verfügen über vermehrte Tn5-Insertionen. Dazu gehören: contig_27 mit 2 Scatterklonen in *peg.266*, contig_31 mit 2 Scatterklonen in *peg.413*, contig_48 mit 5 Scatterklonen in *peg.1387* und contig_44 mit 2 Scatterklonen *peg.1091* sowie jeweils ein Scatterklon in *peg.1216* (Sc26) und 1215 (Sc27). Die Gencluster der Tn5-Insertionsorte der 34 Sc Klone sind in Abb. 26 dargestellt. Um die potentielle Funktion der Gene zu ermitteln, wurden die Aminosäuresequenzen mit bekannten Proteinen verglichen (BLAST) und die dazugehörigen Proteinidentitäten zu Proteinen aus *Fno* sind in der Tab. 23 aufgelistet. Da die genaue Funktion der Gene nicht weiter untersucht wurde, können die hier weiter behandelten Gene nur als putative Gene bzw. Proteine bezeichnet werden. Die Mehrheit (15 Gene, Tab. 23, Abb. 26) der Gene, in denen das Tn5 inserierte, kodieren für putative Gene des Stoffwechsels, unter anderem die Glucokinase *glk* (*peg.721*, Sc#50), Transaldolase *tala* (*peg.1272*, Sc#49) und Prolin-Dehydrogenase *putA* (*peg.228*, Sc#33). Weitere 13 inaktivierte Gene kodierten für putative Proteine, die am Aufbau und Metabolismus der Zellhülle beteiligt sind, wie z.B. das Lipoprotein *lptE* (*peg.266*, Sc#37) sowie verschiedene Transferasen, u.a. *gtrB* (*peg.1447*, Glyceroltransferase, Sc#19) und *htrB* (*peg.1096*, Acetyltransferase, Sc#30). Sechs weitere putative Gene wurden identifiziert, von denen zwei nicht-annotiert sind. Mithilfe des Scatterscreens war es möglich insgesamt 9 putative Kandidaten (in 15 Scatterklonen) bereits beschriebene Virulenzgene in F-W12 zu identifizieren, dazu zählten unter anderem:

die Uridylyltransferase *galU* (*peg.413*, Sc#14, #16), Pyruvat-phosphat Dikinase *ppdK* (*peg.1091*, Sc#22, #24), das Metalloprotease *ftsH* (*peg.1522*, Sc#7), Chitinase (*peg.816*, Sc#51) und die Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase *glpD* (*peg.792*, Sc#62) (Abb. 26).

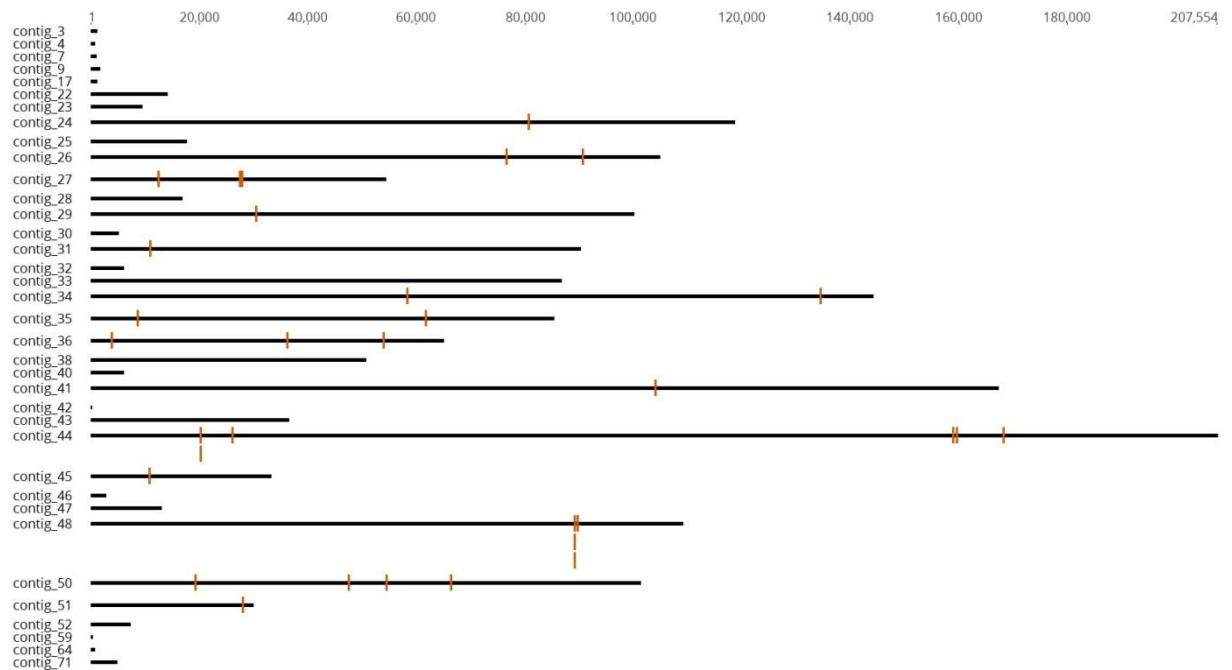
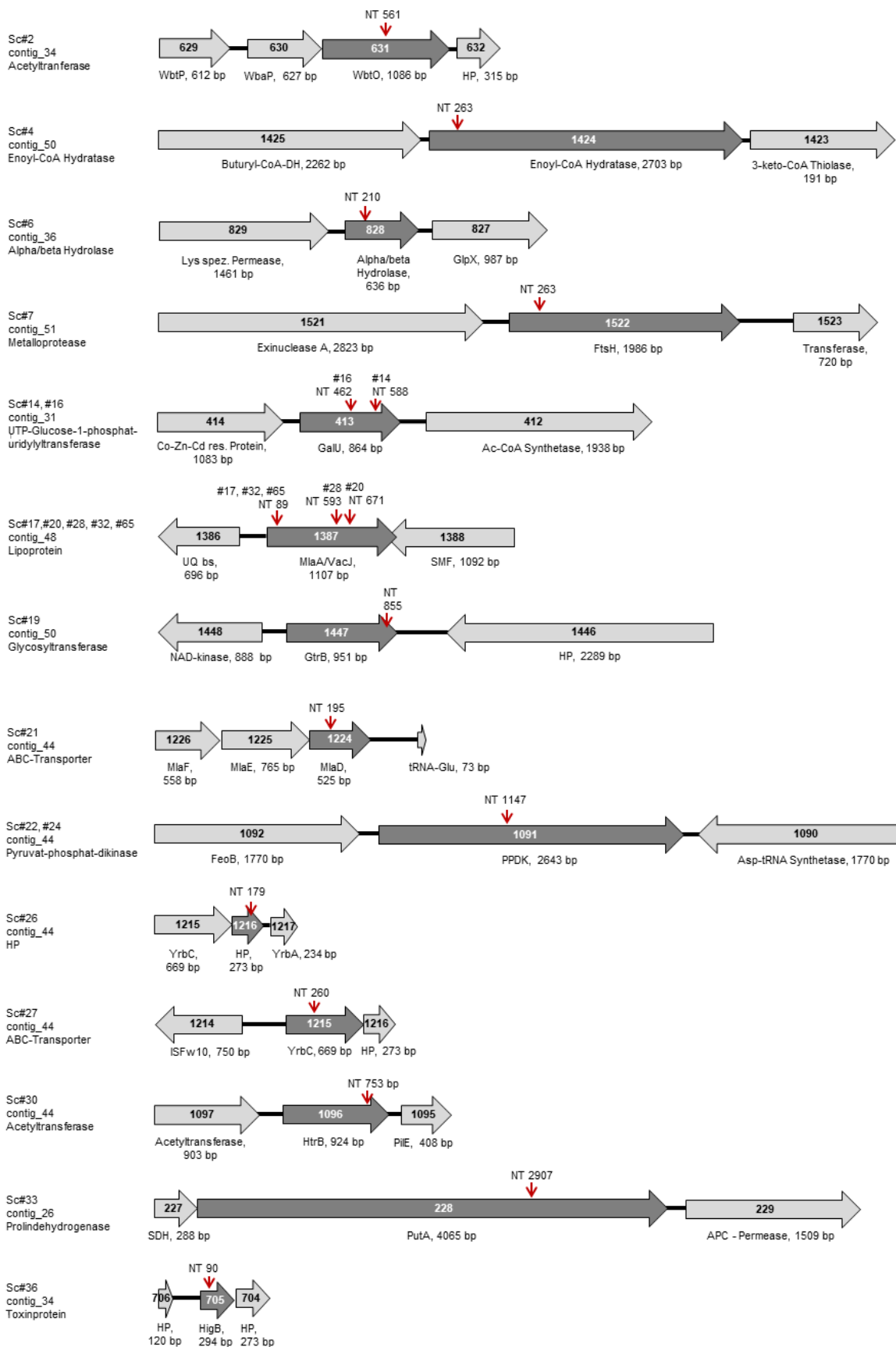


Abb. 25: Verteilung der Tn5-Insertionsorte innerhalb des F-W12 Genoms. Von 34 Scatterklonen wurde der Tn5-Insertionsort durch eine inverse PCR ermittelt. Dargestellt sind die 36 Contigs mit Protein-kodierenden Genen von F-W12. Die Insertionsorte des Transposons sind mit roten Strichen markiert.



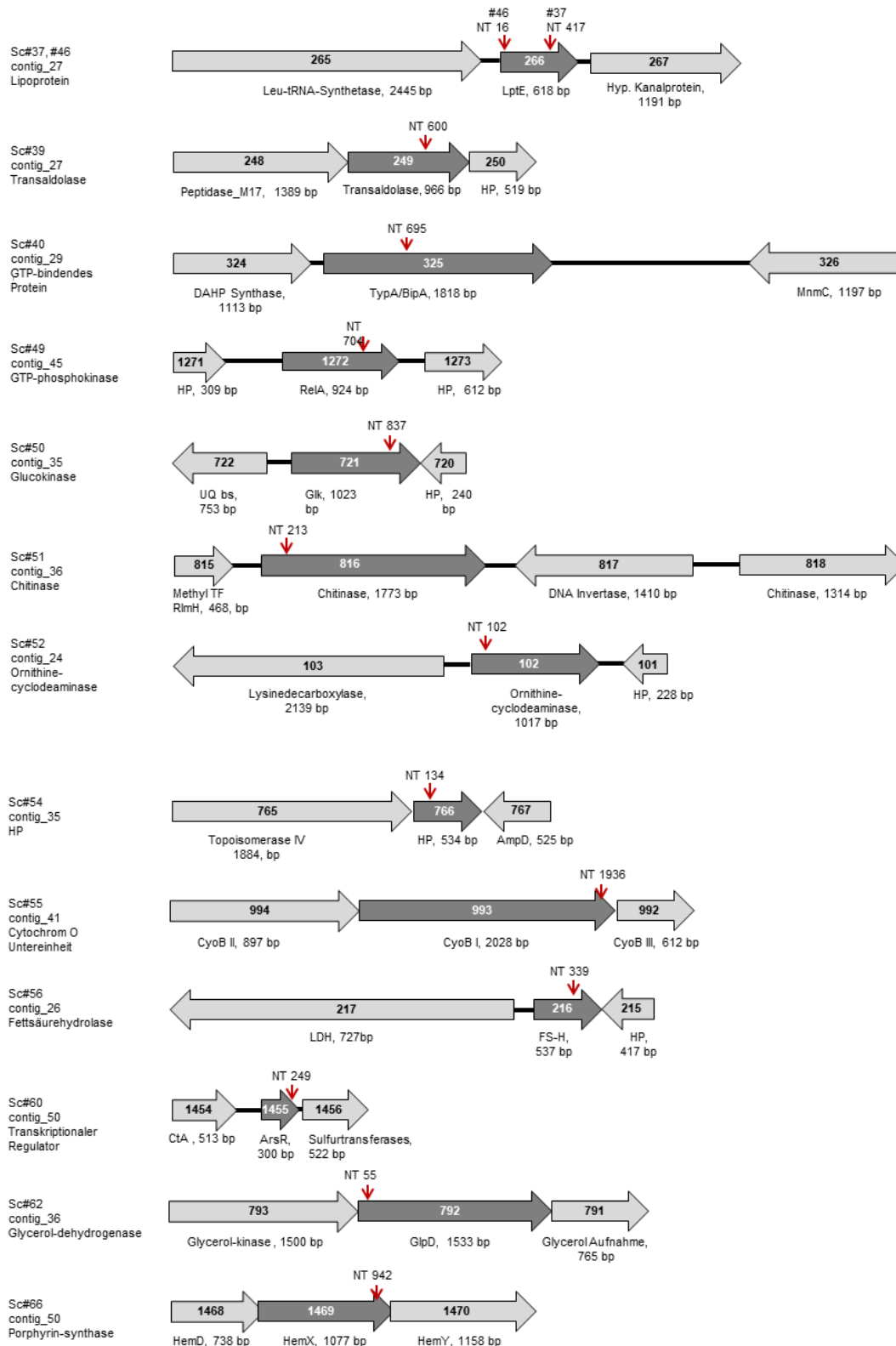


Abb. 26: Chromosomale Lokalisation der Tn5-Insertionsorte. Von 34 Scatterklonen wurde der Tn5-Insertionsort durch eine inverse PCR ermittelt. Dargestellt sind die Gene, in denen das Transposon inserierte (dunkelgrau) und die entsprechenden up- und downstream Gene (hellgrau). Die Zahl in den Gen-Pfeilen gibt die peg. Nummer an. Die Position des Transposons ist durch den roten Pfeil symbolisiert. Die genaue Nukleotid-Position (NT) des Tn5, die Gengrößen (in bp) und die putativen Genprodukte sind dargestellt. Verändert nach Köppen et al. 2019 [215].

1.3.3.1. Identifizierte Gene des Stoffwechsels

Von den 79 gesicherten Scatterklonen wurden 15 Klone identifiziert, bei denen das Tn5 Transposon in Gene des Stoffwechsels inserierte [215]. Da ein Gen in zwei unabhängigen Scatterklonen inaktiviert wurde, wurden insgesamt 14 Gene gefunden: Hydratase (Sc#4), Hydrolase (Sc#6), *ftsH* (Sc#7), *ppdK* (Sc#22, #24), *putA* (Sc#33), *talA* (Sc#39), *spoT/relA* (Sc#49), *glk* (Sc#50), Chitinase (Sc#51), Cyclodeaminase (Sc#52), *cyoB* (Sc#55), Hydroxylase (Sc#56), *glpD* (Sc#62) und *hemX* (Sc#66). Die genaue Nukleotidposition des Transposons und der Genombereich der jeweiligen Scatterklone sind in Tab. 23 und Abb. 26 einzusehen. Von diesen 15 Scatterklonen besaßen drei eine stark verminderte Überlebensrate ($\leq 0,1$; Sc#7 [*ftsH*::Tn5], Sc#39 [*talA*::Tn5], Sc#49 [*spoT/relA*::Tn5]), vier Klone eine verminderte ($\leq 0,5$; Sc#4 [Hydratase::Tn5], Sc#51 [Chitinase::Tn5], Sc#52 [Cyclodeaminase::Tn5], #62 [*glpD*::Tn5]) und die Mehrheit (sechs) eine dem Wildtyp-ähnliche Überlebensrate ($0,5 - 1,5$; Sc#6 [Hydrolase::Tn5], Sc#22 [*ppdK*::Tn5], Sc#24 [*ppdK*::Tn5], Sc#55 [*cyoB*::Tn5], Sc#56 [Hydroxylase::Tn5], Sc#66 [*hemX*::Tn5]) (Tab. 23, Abb. 27). Die Klone Sc#33 (*putA*::Tn5) und Sc#50 (*glk*::Tn5) zeigten eine leicht erhöhte Überlebensrate ($\geq 1,5$) gegenüber *A. lenticulata* 118 als der Wildtyp F-W12.

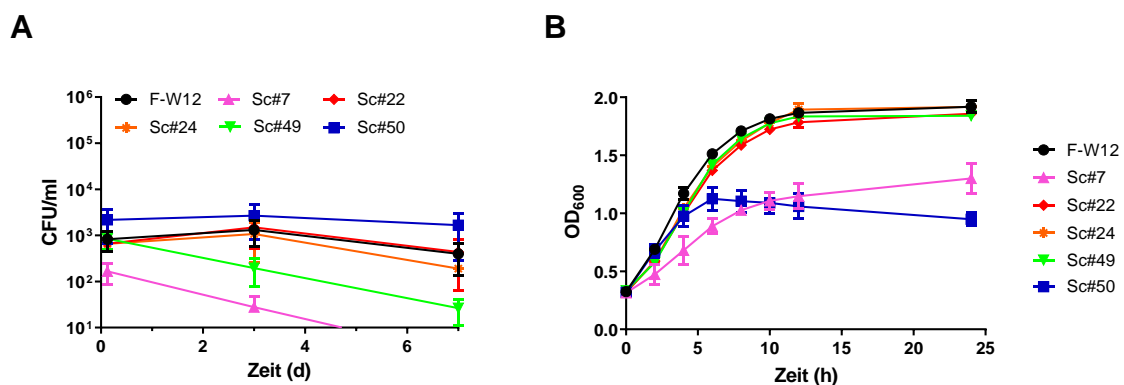


Abb. 27: Analyse von ausgewählten Transposoninsertionsmutanten des Stoffwechsels. A: Persistenzassay mit *A. lenticulata* 118. Die Amöben wurden für 2 h mit F-W12 und Scatterklonen (Sc) mit einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. **B:** In 25 ml Medium T wurden 3×10^3 ZZ/ml inokuliert und über 24 h bei 37 °C und 250 rpm kultiviert und die optische Dichte (OD₆₀₀) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Versuchen. Verändert nach Köppen et al. 2019 [215].

In Abb. 27 A sind beispielhaft die Kurven der Persistenzassays von ausgewählten Scatterklonen dargestellt. Um einen Einfluss auf das Persistenzverhalten durch eventuelle allgemeine Replikationsdefekte der Scatterklone auszuschließen, wurde das Wachstum der

Scatterklone im Vollmedium untersucht (Abb. 27 B). Nur zwei der 15 Sc Klone mit inaktivierten Stoffwechselgenen (Sc#7 [*ftsH*::Tn5] und Sc#50 [*glk*::Tn5]) zeigten ein vermindertes Wachstum im Medium T, alle weiteren getesteten Klone wiesen keinen Wachstumsdefekt auf (Abb. 27 B). Innerhalb der 14 identifizierten Stoffwechselgene wurden fünf bereits bekannte Virulenzfaktoren in sechs Klonen gefunden, dazu zählten: *ftsH* (Sc#7), *spoT/relA* (Sc#49), Chitinase (Sc#51), *glpD* (Sc#62), *ppdK* (Sc#22, #24) (Tab. 23).

1.3.3.2. Identifizierte Gene der Zellhülle

Unter den 79 isolierten Scatterklonen befanden sich 13 Klone, die das Tn5 Transposon in einem Gen trugen, welches möglicherweise am Aufbau, der Funktion und Aufrechterhaltung der Zellhülle beteiligt ist [215]. In drei Genen integrierte das Tn5 Transposon mehrfach, sodass insgesamt sieben Gene identifiziert wurden: *degT/wbtQ* (Sc#2), *galU* (Sc#14, #16), *mlaA/vacJ* (Sc#17, #20, #28, #32, #65), *gtrB* (Sc#19), *mld* (Sc#21), *htrB* (Sc#30), *lptE* (Sc#37, #46). In Abb. 26 sind die genauen Tn5-Insertionsorte der Scatterklone dargestellt. Interessanterweise wurden Scatterklone mit inaktiviertem *mld* und *lptE* Genen beim Scatterscreen Verfahren in unterschiedlichen Amöben (*A. lenticulata* 45 und 118) und bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur (RT und 25 °C) gefunden. Dadurch konnte die Effektivität des Hochdurchsatzverfahrens bestätigt werden. Von den 13 Scatterklonen zeigten sieben Klone eine stark verminderte Persistenz (Überlebensrate $\leq 0,1$; Sc#2 [*degT/wbtQ*::Tn5]; #14, #16 [*galU*::Tn5]; Sc#17, #20 [*mldA/vacJ*::Tn5]; Sc#19 [*gtrB*::Tn5], Sc#37 [*lptE*::Tn5]) und die restlichen sechs eine verminderte Persistenz (Überlebensrate $\leq 0,5$; Sc#28, #32, #65 [*mldA/vacJ*::Tn5]; Sc#21 [*mldD*::Tn5], Sc#30 [*htrB*::Tn5], Sc#46 [*lptE*::Tn5]) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 28 A + B und Tab. 23). Interessanterweise wiesen unterschiedliche Scatterklone, in denen das Tn5 im selben Gen inserierte, nicht automatisch das gleiche Verhalten im Persistenzassay auf (vgl. *mldA/vacJ*-Insertionsort: Sc#17 und #20 stark verminderte Persistenz und Sc#28, #32 und #65 verminderte Persistenz; sowie *lptE*-Insertionsort: Sc#37 stark vermindert und Sc#46 vermindert). Auch die Scatterklone mit inaktivierten Genen der Zellhülle wurden auf das Wachstum im Vollmedium untersucht, um allgemeine Replikationsdefekte auszuschließen, die einen Einfluss auf das *in vivo* Verhalten haben könnten. Nur Sc#2 (*degT/wbtQ*::Tn5) zeigte ein reduziertes Wachstum im Vollmedium (Tab. 23, Abb. 28 D). Alle anderen Scatterklone wiesen ähnliche Wachstumskurven wie der Wildtyp F-W12 auf.

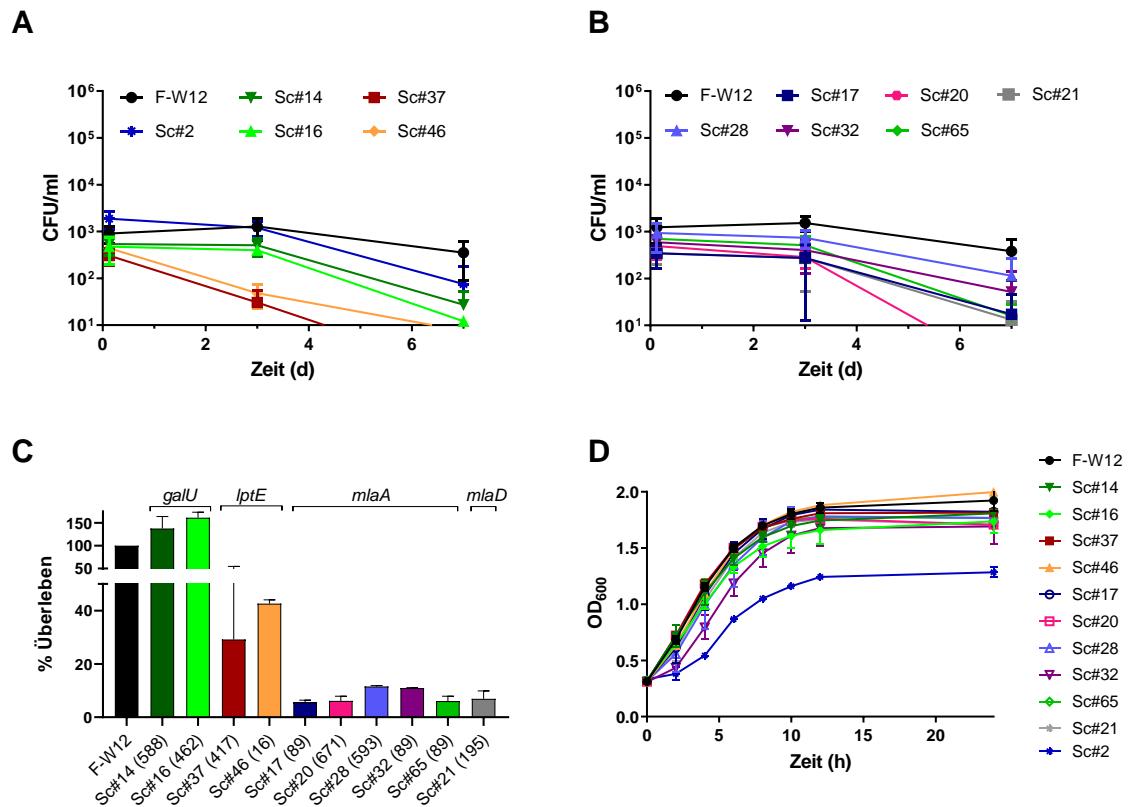


Abb. 28: Analyse von ausgewählten Transposoninsertionsmutanten der Zellhülle. A – B: Persistenzassay mit *A. lenticulata* 118. Die Amöben wurden für 2 h mit F-W12 und Scatterklonen (Sc) mit einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. In **A** sind die Sc#14, #16 (*galU*::Tn5) und Sc#37, #46 (*lptE*::Tn5) und in **B** Sc#17, #20, #28, #32, #65 (*mlaA*::Tn5) und Sc#21 (*mlaD*::Tn5) exemplarisch dargestellt. **C:** SDS-Sensitivitätstest. Die stationär gewachsenen Bakterien wurden für 5 min mit 0,1 % SDS versetzt und anschließend zur Bestimmung der kultivierbaren Bakterien auf Nährböden ausplattiert. Dargestellt ist das durchschnittliche Überleben in Prozent (%) \pm SD aus zwei unabhängigen Versuchen, wobei der Wildtyp F-W12 als 100 % definiert wurde. In Klammern ist die Nukleotid-Position der Tn5-Insertion angegeben. **D:** In 25 ml Medium T wurden 3×10^3 ZZ/ml inokuliert und über 24 h bei 37 °C und 250 rpm kultiviert und die optische Dichte (OD₆₀₀) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von 2 unabhängigen Versuchen. Verändert nach Köppen et al. 2019 [215].

Um weiter zu prüfen, ob die reduzierte Persistenz der Scatterklone auf der defekten/beeinträchtigten Zellhülle zurückzuführen sein könnte, wurden die Klone in einem SDS-Sensitivitätstest analysiert. Dazu wurden der Wildtyp und die Scatterklone für 5 min mit einer 0,1 % SDS-haltigen Lösung versetzt und anschließend zur Bestimmung der kultivierbaren Bakterien auf Nährböden ausplattiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil der kultivierbaren Bakterien nach der SDS-Behandlung mit der Anzahl der Bakterien ohne SDS-Behandlung berechnet und der Wildtyp F-W12 auf 100 % gesetzt (Abb. 28 C). Bei den *mlaA*::Tn5 Klonen (Sc#17, #20, #28, #32, #65) und dem *mlaD*::Tn5 Klon (Sc#21)

überlebten zwischen 5,6 % bis 11,6 % der Bakterien die SDS-Behandlung. Die Klone Sc#37 und #46 (*lptE::Tn5*) zeigten ebenfalls eine verminderte SDS-Resistenz im Vergleich zum Wildtypen, hier überlebten 29,2 % bzw. 42,63 % den SDS-Stresstest. Im Gegensatz dazu besaßen die Klone Sc#14 und #16 eine vergleichbare SDS-Sensitivität wie der Wildtyp. In der Tab. 23 Ist die Überlebensrate aller Scatterklone aufgelistet, die im SDS-Sensitivitätstest untersucht wurden. Von den insgesamt sieben identifizierten Gene des Stoffwechsels im Rahmen des Scatterscreens wurden drei bereits beschriebene Virulenzfaktoren gefunden, dazu zählten: *galU* (Sc#14, #16), *mlaA/vacL* (Sc#17, #20, #28, #32, #65) und *mldD* (Sc#21).

1.3.3.3. Weitere identifizierte Gene

Weiter wurden 6 Scatterklone gefunden, bei denen das Transposon weder in ein Stoffwechselgen noch in ein Gen der Zellhülle inserierte. In den Klonen lag das Tn5 Transposon in den folgenden Gene inseriert vor: *yrbC* (Sc#27), *typA/bipA* (Sc#40), *higB* (Sc#36), ein Transkriptionsregulator der Familie ArsR (Sc#60) und zwei Gene, welche für hypothetische Proteine (HP) codieren (*peg.1216* [Sc#26], *peg.766* [Sc#54]), wobei das Gen *peg.766* kein annotiertes Homolog in *Francisella* aufweist, jedoch in *A. guangzhouensis*. Die genauen Nukleotidpositionen der Tn5-Insertion und die chromosomale Lokalisation sind in Abb. 26 und Tab. 23 (ebenso die putative Genfunktion) einzusehen. Von diesen 6 Scatterklonen wiesen zwei eine verminderte Überlebensrate in den *A. lenticulata* 118 ($\leq 0,5$; Sc#26 [HP::Tn5], Sc#40 [*typA/bipA::Tn5*]), zwei eine dem Wildtyp-ähnliche (0,5 - 1,5; Sc#27 [*yrbC::Tn5*], Sc#54 [HP::Tn5]) und zwei eine leicht erhöhte Überlebensrate auf ($\geq 1,5$; Sc#36 [*higB::Tn5*], Sc#60 [Transkriptionsregulator::Tn5]) (Tab. 23, Anhang Tab. 28). Keiner dieser sechs Klone zeigte ein Wachstumsdefizit im Vollmedium und es wurde kein zuvor beschriebener Virulenzfaktor identifiziert.

1.4. Stoffwechsel von F-W12

Mithilfe des Scatterscreens wurden putative Faktoren identifiziert, die an der Amöben-*Francisella*-Interaktion beteiligt sein könnten. Bei 15 Scatterklonen war das Tn5 Transposon in putative Stoffwechselgene des F-W12 Stammes inseriert. Generell stellen Stoffwechselwege, insbesondere die Glykolyse und die Gluconeogenese, wichtige Einflussfaktoren für das *in vitro* und *in vivo* Wachstum von *Francisella* dar [239, 253-255]. Aus dem Grund sollte einerseits die im Scatterscreen identifizierte putative

Glucokinase-Mutante (Sc#50) und andererseits der *in silico* gefundenen mögliche Myo-Inositol-Stoffwechselweg von F-W12 näher untersucht werden.

1.4.1. Glucokinase-Mutante (Sc#50)

Der Scatterklon #50 wurde im Scatterscreen mit der Amöbe *A. lenticulata* 118 nach 22 Tagen bei RT isoliert. Daraufhin sollte die Amöbensensitivität der Scattermutante in einem Persistenzassay genauer untersucht werden. Überraschenderweise bestätigte sich die Mutante (Sc#50) nicht als attenuiert gegenüber der Amöbe. Sie besaß eine leicht erhöhte Persistenz bzw. Überlebensrate in *A. lenticulata* 118 als der Wildtyp F-W12 (Tab. 23 und Abb. 27, [215]). Im Gegensatz dazu, zeigte der Sc#50 ein reduziertes Wachstum im Vollmedium; dieser erreichte seine max. OD₆₀₀ von 1,131 nach bereits 6 h, zum Vergleich der Wildtyp F-W12 erreichte die max. OD₆₀₀ von 1,933 nach etwa 12 h (Abb. 27 B). Die Bestimmung des Tn5-Insertionsortes in dieser Mutante ergab, dass das Tn5-Transposon in *peg.271* an der Nukleotidposition 837 (von 1023 bp, Abb. 29 A) inseriert vorlag. Mithilfe einer PCR mit spezifischen Primern, die das Gen *peg.271* amplifizierten, wurde der Insertionsort des Tn5 Transposon bestätigt (Abb. 29 A). Das amplifizierte PCR-Produkt besaß eine Größe von 728 bp im Wildtyp F-W12 (Abb. 29 A, Spur 1) und im Sc#50 eine Größe von 1949 bp (Spur 2). Das größere PCR-Produkt im Sc#50 resultierte aus dem inserierten Tn5-Transposon, welches eine Größe von 1221 bp besitzt. *In silico* Sequenzvergleiche mit Genen aus verschiedenen *Francisella* Spezies ergab, dass das Gen *peg.271* für eine putative Glucokinase kodiert. Die entsprechenden Sequenzvergleiche auf DNA- und Proteinebene sind in Tab. 24 aufgelistet. Die DNA-Sequenzen der Glucokinasen (*glk*) von *Fth* LVS (*FTL_0404*), *Fno* U112 (*FTN_0462*) und *Ftt* (*I295c*) zeigen eine Identität von 99 - 100 % zueinander, wobei die Identität zur putativen Glucokinase-Sequenz von F-W12 (*peg.721*) bei 77 % liegt (Tab. 24). Die putative Glucokinase von *A. guangzhouensis* (*SD28_07565*) besitzt eine Identität von 78 % zu den *Francisella* Stämmen *Fth*, *Fno* und *Ftt* und 90 % Identität zur DNA-Sequenz der putativen Glucokinase von F-W12. Auf Proteinebene liegt die Identität innerhalb der *Francisella* Stämmen bei 100 % und für den F-W12 Stamm bei 86 % sowie für *A. guangzhouensis* bei 88 %. Die Proteinsequenzen von F-W12 und *A. guangzhouensis* besitzen eine Identität von 94 % zu einander (Tab. 24).

Tab. 24: DNA- und Proteinidentität der Glk-Sequenzen im Vergleich. Analysiert wurden die *glk*/*Glk* Sequenzen von *Fth* LVS (FTL_0404; *Fth*), *Fno* U112 (FTN_0462, *Fno*), *Ftt* (FTT_1295c, *Ftt*), F-W12 (Peg.721, W12) und *A. guangzhouensis* (SD28_07565, *Agu*). Der Sequenzabgleich ist im Anhang einzusehen.

<i>glk</i>	<i>Fth</i>	<i>Fno</i>	<i>Ftt</i>	W12	<i>Agu</i>	Glk	<i>Fth</i>	<i>Fno</i>	<i>Ftt</i>	W12	<i>Agu</i>
<i>Fth</i>	100	99	100	77	78	<i>Fth</i>	100	100	100	86	88
<i>Fno</i>		100	99	77	78	<i>Fno</i>		100	100	86	88
<i>Ftt</i>			100	77	78	<i>Ftt</i>			100	86	88
W12				100	90	W12				100	94
<i>Agu</i>					100	<i>Agu</i>					100

Generell katalysiert die Glucokinase die Umwandlung von Glucose in Glucose-6-Phosphat unter ATP Verbrauch und stellt die erste Phosphorylierung bzw. den ersten Schritt in der Glykolyse dar. Um die Hypothese zu überprüfen, dass *peg.271* in F-W12 an der Umsetzung von Glucose beteiligt ist, wurden Wachstumsversuche mit dem Wildtyp F-W12, dem Sc#50 und der generierten Komplementante Sc#50 FIV2-*glk* im Vollmedium mit Glucose (normales Medium T [MT]) bzw. ohne Glucose (MT-Glc) durchgeführt [215]. Wie in Abb. 29 B zu sehen ist, führte das Fehlen von Glucose beim Wildtyp F-W12 zu einem reduziertem Wachstum nach 24 h im Vergleich zum Wachstum im Medium mit Glucose ($OD_{600}[\text{MT-Glc}] = 1,2$ vs. $OD_{600}[\text{MT}] = 2$). Im Gegensatz dazu, hat das Vorhandensein der Glucose keinen Einfluss auf das Wachstum der Mutante (Sc#50). Die OD_{600} Werte waren nach 24 h unabhängig von der Glucose bei etwa 0,9. Das Wachstum der Mutante im Vollmedium war signifikant reduziert gegenüber dem Wachstum des Wildtyp F-W12 ($p < 0,0001$). Die *trans* Komplementierung des Sc#50 mit FIV2-*glk* führte zur Aufhebung des verminderten Wachstums und nach 24 h wurde eine OD_{600} von ~1,8 erreicht (Abb. 29 B). Das Wachstum der Komplementante im Medium mit Glucose war somit dem Wachstum vom Wildtyp F-W12 ähnlich (vergleiche $OD_{600}[\text{F-W12}] = 2$ vs. $OD_{600}[\text{Sc#50 pFI2-}glk] = 1,8$, $p = 0,0845$) und signifikant erhöht im Vergleich zu Sc#50 (vgl. $OD_{600}[\text{Sc#50}] = 0,9$ vs. $OD_{600}[\text{Sc#50 pFI2-}glk] = 1,8$, $p < 0,0001$, Abb. 29 B). Der FIV2-Val Vektor hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten, da Sc#50 mit dem Leervektor FIV2-Val gleiche Kurvenverläufe aufwiesen wie Sc#50 (ebenso zutreffend für F-W12 und F-W12 FIV2-Val, siehe Anhang Tab. 27, [215]).

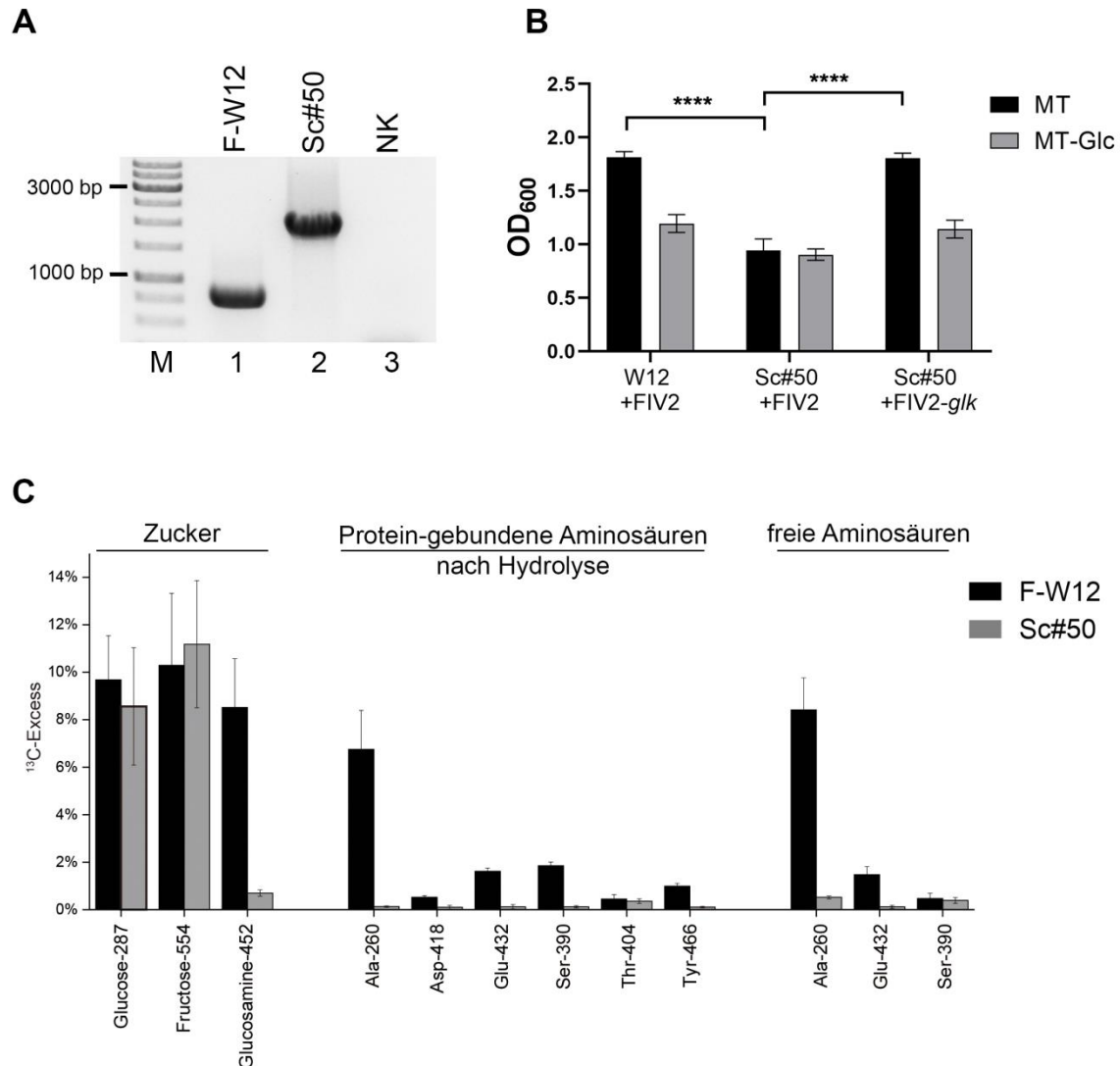


Abb. 29: Analysen zu Scatterklon #50 (Sc#50). **A:** PCR-Überprüfung des Tn5-Insertionsortes im Sc#50. Das Gen *peg.271* wurde mithilfe der Primer *peg.721_F* und *peg.721_R* amplifiziert. Die daraus resultierenden PCR-Produkte besaßen im Wildtypen F-W12 eine Größe von 728 bp und in Sc#50 eine Größe von 1949 bp (728 bp [*peg.271*] + 1221 bp [Tn5 Transposon]). M: Marker GeneRuler 1 kb; NK: Negativkontrolle, kein DNA-Template. Verändert nach Eikenkel 2017 [252]. **B:** Wachstumsanalyse des Wildtypen F-W12 FIV2-Val, des Sc#50 FIV2-Val und der Komplementante Sc#50 FIV2-*glk* in Medium T mit (MT) bzw. ohne Glucose (MT-Glc). Die Kulturen wurden mit 3×10^8 Bakterien/ml inokuliert und für 24 h inkubiert. Die optische Dichte (OD₆₀₀) wurde nach 24 h bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way ANOVA und Dunnett Test für multiple Vergleiche ermittelt (**** $p < 0,0001$). **C:** Der Wildtyp (F-W12) und die Mutante (Sc#50) wurden für 24 h in Medium T mit 11 mM [$U\text{-}^{13}\text{C}_6$]Glukose kultiviert. Anhand der GC/MS-Analysen wurde die Markierung von ^{13}C in mol% in den Zuckern, freien und den Protein-gebundenen Aminosäuren verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von technische Triplikaten aus zwei unabhängigen Versuchen. Verändert nach Köppen et al. 2019, Chen et al. 2020 (in Revision) [215, 216].

Zur weiterführenden Analyse wurden Markierungsversuche in Medium T mit [$U\text{-}^{13}\text{C}_6$]Glukose (11 mM) für den Wildtypen F-W12 und Sc#50 durchgeführt. Die markierten Bakterien wurden nach dem Erreichen der stationären Phase pelletiert,

autoklaviert und weiter mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert. Die GC/MS-Analysen wurden an der TU München von der AG Eisenreich durchgeführt. Hierbei wurden speziell die wichtigsten Metaboliten wie Zucker, freie und Protein-gebundene Aminosäuren analysiert. Alle ^{13}C -Excess-Werte sind im Anhang der Publikation Köppen et al. 2019 [215] einzusehen und ausgewählte sind in Abb. 29 C dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass die Markierung in ^{13}C mol% von Zucker (Glucosamin) und Aminosäuren wie Alanin, Asparaginsäure, Glutamin und Serin in der Sc#50 Mutante reduziert waren im Vergleich zu den Markierungen im Wildtyp F-W12 (Bsp. Glucosamin: F-W12 $8,52\% \pm 2,05\%$ vs. Sc#50 $0,7\% \pm 0,13\%$; freies Alanin: F-W12 $8,41\% \pm 1,35\%$ vs. Sc#50 $0,52\% \pm 0,06\%$, Abb. 29 C) [85]. Jedoch war die Markierung für Fructose in der Mutante und im Wildtyp vergleichbar (F-W12 $10,9\% \pm 3,03\%$ vs. Sc#50 $11,18\% \pm 2,68\%$), was daraus schließen lässt, dass die Umwandlung von Glucose in Fructose in der Mutante nicht gestört zu sein scheint. Anhand dieser Daten lässt sich vermuten, dass das *peg.271* für eine Glucokinase kodiert und am Metabolismus von Glucose in F-W12 beteiligt ist.

1.4.2. Myo-Inositol Stoffwechsel in F-W12

Im Genom des F-W12 Stammes wurde *in silico* ein putatives Operon aus sieben Genen (Contig_27, *peg.279* - 284, 8019 bp) identifiziert, welches am Metabolismus von Myo-Inositol (MI) beteiligt sein könnte. MI ist in der Umwelt weitverbreitet und kann von einigen Bakterien als einzige Kohlenstoffquelle genutzt werden [256-258]. Das MI wird durch eine MI Oxygenase zu Glucuronat umgewandelt und mithilfe weiterer enzymatischer Schritte in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat abgebaut [259-261]. Das putative Operon im F-W12 codiert für Proteine, zu denen Homologe in anderen *Francisella* Spezies gefunden wurden (Tab. 25, Abb. 30). Dabei handelte es sich um einen putativen Zuckertransporter (*peg.283*), einer MI-Oxygenase (*peg.284*), Glucuronat-isomerase (*peg.282*), Mannonat-oxidoreduktase (*peg.278*), Mannonat-dehydratase (*peg.279*), 2-Keto-3-deoxygluconat (KDG) -Kinase (*peg.280*) und 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDGP) -Aldolase (*peg.281*) (Tab. 25, Abb. 30). Die größten Proteinidentitäten (65 - 87 %) wurden zu Proteinen in *F. hispaniensis* 3523 (FN3523, früher als *Fno*-ähnlicher Stamm klassifiziert) gefunden und sind in der Tab. 25 aufgelistet [216].

Tab. 25: Gene des putativen MI-Metabolismus in F-W12. Aufgelistet sind die sieben Gene des putativen MI-Operons (*peg.278-284*). Die Proteinsequenzidentität zu Proteinen aus *F. hispaniensis* 3523 (FN3523) wurde analysiert.

<i>peg.</i>	Größe (aa)	Annotation/Funktion	Enzym	% Identität zu FN3523
278	494	D-Mannonat-oxidoreduktase (UxuB)	EC 1.1.1.57	73
279	395	Mannonat-dehydratase (UxuA)	EC 4.2.1.8	86
280	314	KDG-Kinase (KdgK)	EC 2.7.1.45	69
281	182	KDGP-Aldolase (KdgA oder Eda)	EC 4.1.3.16	65
282	468	Glucuronat-isomerase (UxaC)	EC 5.3.1.12	83
283	449	Zuckertransporter, Pfam_MFS_1	-	83
284	326	MI-oxygenase (MIOX)	EC 1.13.99.1	86

KDG: 2-Keto-3-deoxygluconat; KDGP: 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat; MI: Myo-Inositol

Der so genannte Glucuronat-Katabolismus-Locus wurde bereits in *Fno* Fx1 und *F. hispaniensis* (*Fhi* FN3523) beschrieben [262] und ist dem MI-Gencluster von F-W12 ähnlich (Abb. 30). Darüber hinaus konnte ein putatives MI-Gencluster ebenfalls in *A. guangzhouensis* (*Agu*) und *F. halioticida* (*Fha*) identifiziert werden [216]. Zusätzlich zu den sieben in F-W12, *Agu* und *Fha* gefundenen putativen Genprodukten (UxuB, UxuA, KdgK, Eda, UxaC, MFS-SP, MIOX) verfügen *Fno* Fx1, *Fhi*-FN3523 und *Fph* über einen Melibiose-transporter und über eine putative Sucrase (α -Glucosidase) (Abb. 30), diese Gene sind in F-W12, *Agu* und *Fha* nur noch als Pseudogene vorhanden. In F-W12 und *Fph* könnte ein Insertionselement bzw. eine Integrase für die Deletion verantwortlich sein. Darüber hinaus fehlt ein MI-Gencluster in *Fth* (wie z.B. *Fth* LVS) und in *Fno* U112. Sie stellen somit natürliche Mutanten des putativen MI-Genclusters dar (Abb. 30).

Um zu untersuchen, ob das *in silico* identifizierte Operon am MI-Metabolismus beteiligt ist, wurde eine F-W12 Mutante (Δ Myo) generiert, bei der alle sieben Gene des putativen Operons deletiert und durch eine Km-Kassette ausgetauscht wurden (siehe Abb. 12). Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR und Sanger-Sequenzierung überprüft (siehe II.2.6) und auf Wachstumsdefekte im Vollmedium untersucht. Die Δ Myo Deletionsmutante wies keine Replikationsdefekte auf (siehe Anhang Tab. 27). Ebenso wurde eine F-W12 Δ Myo Komplementante hergestellt, indem die Gene *peg.278 - 284* mithilfe einer PCR amplifiziert und in den pGEM-T Easy Vektor ligiert wurden (siehe II.2.3.7 und II.2.7).

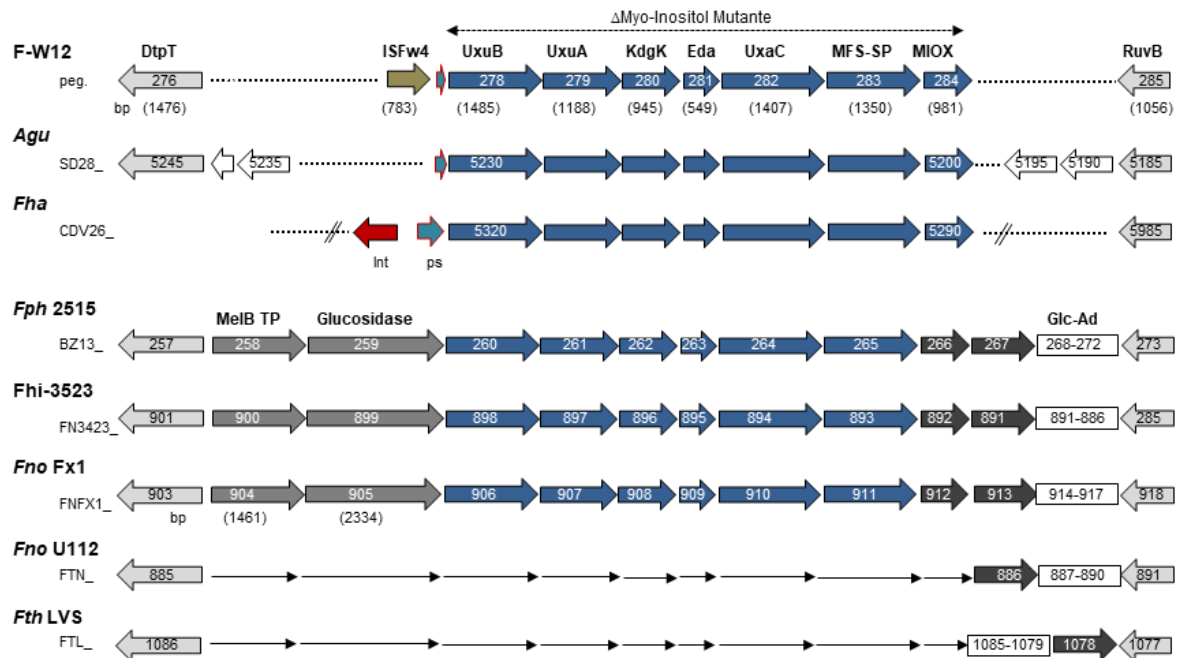


Abb. 30 A: Putatives MI-Operon in F-W12 und weiterer *Francisella*. Dargestellt sind die MI-Gencluster von F-W12, *A. guangzhouensis* (Agu), *F. halitotica* (Fha), *F. philomiragia* ATCC 25015 (Fph 2515), *F. hispaniensis* 3523 (Fhi 3523), *Fno Fx1*, *Fno U112* und *Fth LVS*. Die ORFs (Gene) sind als Pfeile dargestellt. Die putativen Genprodukte stehen über den Pfeilen und darunter sind die Gengrößen in Klammern aufgelistet. Die Gene des MI-Clusters sind in blau markiert, die up- und downstream Gene sind in Grautönen dargestellt. Pseudogene (ps) sind rotumrandet und in grün ist ein Insertionselement (ISFw4) und in rot eine Integrase (Int) symbolisiert. Die Längen der Pfeile repräsentieren die Gengrößen. Nicht vorhandene Gene sind durch dünne Pfeile markiert und die deletierten Gene der Myo-Inositol Mutante des F-W12 werden durch einen gestrichelten beidseitigen Pfeil oberhalb der Gene gekennzeichnet. Verändert nach Chen et al. 2020 (in Revision) [216].

Die Insert-DNA-Sequenz wurde durch die Sanger-Sequenzierung überprüft. Ein fehlerfreies DNA-Insert wurde weiter für die Klonierung in den pFIV2-Val Vektor verwendet. Auch die Δ Myo FIV2-Myo Komplementante zeigte keine Veränderung im *in vitro* Wachstum (siehe Anhang Tab. 27). Um zu testen, ob F-W12 das MI nutzen kann, wurde das Wachstum von F-W12, Δ Myo, Δ Myo FIV2-Myo in Medium ohne Glucose (MT-Glc) und mit MI supplementiert (MT-Glc+MI) untersucht. Um auszuschließen, dass der FIV2-Val Vektor einen Einfluss auf das *in vitro* Wachstum hat, wurden der Wildtyp F-W12 und die Δ Myo Mutanten mit dem „Leervektor“ FIV2-Val untersucht. Dazu wurden die Medien mit 3×10^8 CFU/ml mit den Stämmen F-W12 FIV2, F-W12 Δ Myo FIV2, Δ Myo FIV2-Myo sowie *Fno Fx1* und *Fno U112* inokuliert und nach 9 h der Kultivierung die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Die Zugabe von MI im Medium ohne Glucose (MT-Glc+MI) führte zu signifikant höheren OD-Werten beim F-W12, Δ Myo FIV2-Myo und Fx1 im Vergleich zum Wachstum ohne Glucose und ohne MI (Abb. 31 A + B). Dieser

Anstieg war jedoch geringer als beim Wachstum im Vollmedium. Im Gegensatz dazu führte MI nicht zu höheren OD₆₀₀-Werten bei der F-W12 Δ Myo Mutante und bei *Fno* U112. Die Δ Myo Mutante zeigte sogar ein signifikant reduziertes Wachstum im Medium ohne Glc und mit Mi supplementiert im Vergleich zu MT-Glc (Abb. 31). Das reduzierte Wachstum von Δ Myo konnte mithilfe der Transformation von FIV2-Myo komplementiert werden. Aufgrund der „Überexpression“ durch den FIV2-Val Vektor, waren die OD₆₀₀ leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp F-W12 (Abb. 31 A).

Die oben gezeigten Wachstumsversuche gaben Hinweise darauf, dass MI vermutlich von F-W12 genutzt werden kann. Zur weiterführenden Analyse wurden Markierungsversuche (mit Myo-Inositol-C-²H₆; MI trägt an allen sechs Kohlenstoffpositionen Deuterium-Atome) mit F-W12 und Δ Myo durchgeführt. Dazu wurden F-W12 und Δ Myo in Minimalmedium (CDM) ohne Glc mit 9,13 mM ²H₆-MI und 21,65 mM unmarkiertem MI supplementiert und für 50 h kultiviert. Die Zunahme der bakteriellen Dichte (Wachstum) wurde durch das Bestimmen der optischen Dichte kontrolliert (Abb. 31 C). Bei Δ Myo war keine Zunahme der OD₆₀₀ nach 50 h zu beobachten (Abb. 31 C), ebenso nicht bei der natürlichen Mutante *Fno* U112 (Abb. 31 D, Wachstum in CDM mit 30 mM unmarkiertem MI). Im Gegensatz dazu nahm die OD₆₀₀ während der Kultivierung von *Fno* Fx1 und F-W12 um das 2,5 bis 3-fache zu (Abb. 31 C + D). Die Proben von F-W12 und Δ Myo wurden nach 50 h der Kultivierung pelletiert, autoklaviert und weiter mittels GC/MS analysiert. Die GC/MS-Untersuchungen wurden an der TU München von der AG Eisenreich durchgeführt. Alle ²H-Excess-Werte sind im Anhang der Publikation Chen et al. einzusehen und eine Auswahl der Daten ist in Abb. 31 E ersichtlich [216]. Teils hohe Markierungen repräsentiert durch ²H-Excess-Werte (in mol%) waren im Wildtyp F-W12 in den Protein-gebundenen (Bsp. Phe 5,29 ± 0,03 mol%) und freien Aminosäuren (Bsp. Phe 8,21 ± 0,06 mol%) sowie in den Zuckern (Bps. Glucose 4,63 ± 0,41 mol%) und freien Metaboliten (Bsp. Lactat 3,14 ± 0 mol%) zu finden. Im Gegensatz dazu waren die Markierungen in der Δ Myo Mutante deutlich geringer (Bsp.: Protein-gebundenes Phe 0,08 ± 0,02 mol%; freies Phe 0 mol%; Glucose 0,17 ± 0,07 mol%; Lactat 0,72 ± 0,02 mol%; siehe Abb. 31 E). Daraus lässt sich schließen, dass das MI-Gencluster in F-W12 in der Umsetzung von MI beteiligt ist [216].

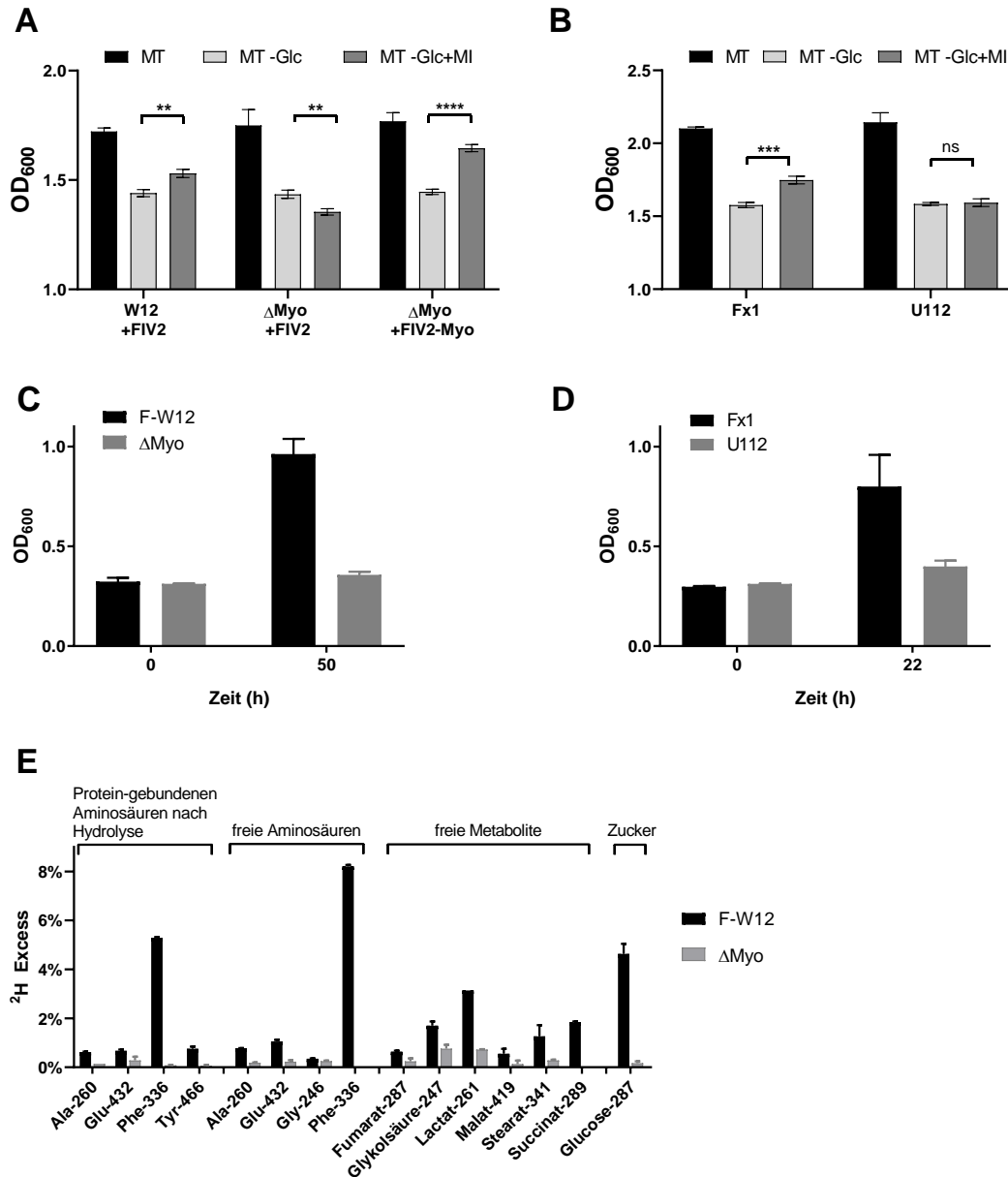


Abb. 31: Analysen zum MI-Stoffwechselweg in F-W12. A – B: Wachstumsanalyse des Wildtyp F-W12 (F-W12 FIV2), der MI-Deletionsmutante (Δ Myo FIV2) und der MI-Komplementante (Δ Myo FIV2-Myo) (A) sowie *Fno* Fx1 (Fx1) und *Fno* U112 (U112) in Vollmedium (Medium T, MT), in Medium T ohne Glucose (MT-Glc) sowie in Medium T -Glc mit Myo-Inositol (MT-Glc+MI). Die Kulturen wurden mit 3×10^8 Bakterien/ml inokuliert und nach 9 h der Inkubation wurde die optische Dichte (OD_{600}) bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch einen zweiseitige t-Test ermittelt (** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, ns nicht signifikant) (Prism 8). C – D: Wachstum von F-W12 und Δ Myo (C) sowie Fx1 und U112 (D) in Minimalmedium (CDM) ohne Glucose supplementiert mit MI. Das bakterielle Wachstum wurde durch die Messung der OD_{600} zu Beginn des Experimentes (0 h) und nach 50 h (C) bzw. 22 h (D) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Versuchen. E: Der Wildtyp (F-W12) und die Mutante (Δ Myo) wurden für 50 h in CDM mit 9,13 mM 2H_6 -MI und 21,65 mM unmarkiertem MI kultiviert. Anhand der GC/MS-Analysen wurde die Markierung von 2H in mol% in den Protein-gebundenen und freien Aminosäuren, den freien Metaboliten und den Zuckern verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von technische Triplikaten aus einem Versuch. Verändert nach Chen et al. 2020 (in Revision) [216].

2. Humanes *ex vivo* Lungeninfektionsmodell

Für bisherige Virulenz- und Pathogenitätsstudien zu *Francisella* wurden ausschließlich Zelllinien oder Tiermodelle verwendet (abgesehen von den humanen Impfstudien in den 1950-er Jahren [8, 9, 79]). Daher sollte ein humanes *ex vivo* Lungeninfektionsmodell für *Francisella* etabliert werden, um die Virulenz und Pathogenität in einem komplexem System mit verschiedenen Zelltypen untersuchen zu können. Die Verwendung von humanem Gewebe war ebenso von großer Bedeutung, da *Francisella* Vertreter eine wirtsspezifische Pathogenität aufweisen (*Fno* ist z.B. hochvirulent für Mäuse, jedoch kaum für den Menschen). Für verschiedene Humanpathogene, z.B. *L. pneumophila*, *S. pneumoniae* oder Influenza-Viren, wurde bereits ein *ex vivo* Lungeninfektionsmodell etabliert um die Virulenz und die Lokalisation des Erregers darzustellen [263-265]. Dabei werden Lungengewebestücken von Patienten verwendet und außerhalb der Körpers im Labor mit dem Erreger infiziert (daher die Bezeichnung *ex vivo*). Ein ähnliches *ex vivo* Modell galt es im Rahmen dieser Doktorarbeit für *Francisella* zu etablieren.

Für das humane *ex vivo* Lungenmodell wurden mir Lungengewebestücke von der Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Berlin (AG Hippenstiel und AG Hocke) zur Verfügung gestellt (siehe II.1.6). Das humane Lungengewebe wurde während chirurgischer Eingriffe (Lungensektionen) bei Bronchialkarzinompatienten an verschiedenen Zentren der Charité Berlin entnommen. Das tumorfreie Gewebe wurde in 3×8×8 mm (80 bis 200 mg) große Lungengewebsstücke geschnitten und konnte für die Infektion verwendet werden. Abweichend zu den *in vitro* Infektionen von Zellkulturen, werden bei der Infektion des Lungengewebes die Bakterien mithilfe einer Infusionsnadel direkt in das Gewebe injiziert (siehe II.2.11.2). Um nach der Infektion und Inkubation die Anzahl der kultivierbaren intrazellulären Bakterien bestimmen zu können, ist es notwendig, dass das Lungengewebe homogenisiert und die Zellen lysiert werden. Das erfolgte mithilfe eines FastPrep Homogenisierers, einer Lysing Matrix und durch die Zugabe von Saponin. Um sicher zu stellen, dass die *Francisella* Bakterien das Homogenisieren des Lungengewebes mit der Lysing Matrix und dem FastPrep überleben, wurden etwa 10⁴ Bakterien (*Fth* LVS) in 1 ml PBS in die Lysing Matrix überführt, für 10 sec im FastPrep homogenisiert und zur CFU/ml-Bestimmung auf Nährböden ausplattiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Bakterien und Bakterien in der Matrix, welche für 10 sec auf höchster Stufe gevortext wurden, verwendet (Abb. 32 A). Wie der Abb. 32 A zu entnehmen ist, war die Anzahl der kultivierbaren Bakterien nach den drei Behandlungen etwa gleich. Somit konnte das Lungengewebe mit dem FastPrep

und der Lysing Matrix homogenisiert werden, ohne dass die Anzahl der *Francisella* Bakterien signifikant reduziert wurde.

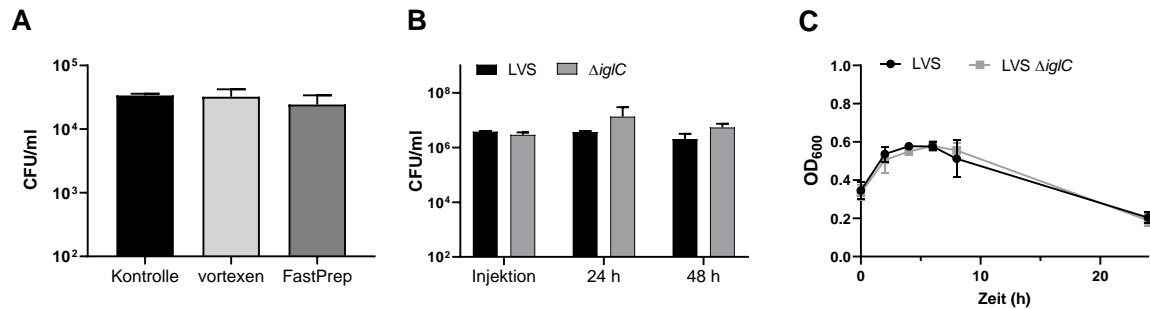


Abb. 32: Vortestung für das *ex vivo* Lungenmodell. **A:** Einfluss der Lysing Matrix und der FastPrep-Behandlung auf *Fth* LVS. Die Bakterien wurden in die Lysing Matrix gegeben und anschließend für 10 sec entweder gevortext (vortexen) oder im FastPrep behandelt (FastPrep). Als Kontrolle dienten unbehandelte Bakterien (Kontrolle). Zur Bestimmung der Anzahl der kultivierbaren Bakterien (CFU/ml) wurden die Suspensionen auf Nährböden ausplattiert und gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Versuchen. **B:** *Ex vivo* Lungenmodell. Das Lungengewebe wurde mit *Fth* LVS und *Fth* LVS \DeltaiglC (etwa 10^6 CFU/ml) für 2 h infiziert und anschließend 3x gewaschen. Nach 24 h und 48 h wurden die Gewebestücke durch die Zugabe von Saponin in einer Lysing Matrix im FastPrep homogenisiert und die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus einem Versuch. **C:** Wachstum von *Fth* LVS und *Fth* LVS \DeltaiglC in RMPI mit 10 % FCS. In 25 ml Medium wurden etwa 3×10^3 ZZ/ml inokuliert und über 24 h bei 37 °C und 250 rpm kultiviert und die optische Dichte (OD₆₀₀) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Versuchen.

Die erste Testinfektion des humanen Lungengewebes wurden mit *Fth* LVS und der intrazellulären Replikationsmutante *Fth* LVS \DeltaiglC ähnlich zum Infektionsmodell von *S. pneumoniae* durchgeführt [224, 234]. Dabei werden die Bakterien ($\sim 10^6$ CFU/ml) in das Gewebe injiziert und die Gewebestücken so lange inkubiert, bis die CFU/ml oder andere Parameter, wie z.B. Zytokine, bestimmt werden sollen [224, 234]. Da jedoch zunächst nur die intrazelluläre Replikation von *Fth* verfolgt werden sollte, wurden die Lungenstücke mit $3,4 \times 10^6$ CFU/ml *Fth* LVS bzw. *Fth* LVS \DeltaiglC Bakterien injiziert und für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, das Gewebe gut gewaschen und für 24 h bzw. 48 h weiter kultiviert. Zur Bestimmung der kultivierbaren Bakterien wurde die Lungengewebsproben homogenisiert (siehe oben) und die Suspension auf Nährböden ausplattiert und ausgezählt. Wie in Abb. 32 B erkennbar ist, waren nach 24 h und 48 h $3,7 \times 10^6$ CFU/ml bzw. 2×10^6 CFU/ml in den mit *Fth* LVS-infizierten Lungenstück und $1,3 \times 10^7$ CFU/ml bzw. $5,4 \times 10^6$ CFU/ml in den mit *Fth* LVS \DeltaiglC -infizierten Lungenstück detektierbar. Demnach war kein markanter Unterschied in der CFU/ml zwischen *Fth* LVS

und *Fth* LVS \DeltaiglC Mutante erkennbar, was auf eine Kokultur schließen lässt. Zur Minimierung der extrazellulären Replikation der *Francisella* scheint auch im humanen *ex vivo* Lungenmodell eine Behandlung mit Gentamicin notwendig zu sein (ebenso wie bei den *in vitro* Infektionen, siehe Abb. 18 und Abb. 20). Wie der Abb. 32 C weiter zu entnehmen ist, vermehrten sich *Fth* LVS und *Fth* LVS \DeltaiglC innerhalb einer sechsständigen Inkubation im RPMI-Medium mit 10 % FCS um etwa das 1,7-fache ($OD_{600} = 0,346 [\pm 3,4 \times 10^8/\text{ml}]$ auf $OD_{600} = 0,576 [\pm 5,7 \times 10^8/\text{ml}]$). Allerdings nahm die Zelldichte bei der weiteren Kultivierung wieder ab (Abb. 32 C). Um dennoch die Möglichkeit einer Vermehrung von *Francisella* in Kokultur zu minimieren, wurde für die Lungeninfektion und die anschließende Kultivierung RPMI ohne FCS verwendet. Des Weiteren entsprachen die CFU/ml-Werte nach 24 h und 28 h in etwa der Bakterienzahl, die für die Injektion verwendet wurde (siehe Injektion Abb. 32 B). Wie bereits die *Fth*-Infektionen von J774 und U937 Zellen zeigten (siehe Abb. 18 und Abb. 20), sind von den etwa 5×10^6 CFU/ml, die zur Infektion eingesetzt wurden, nur etwa 10^4 CFU/ml nach 3 h nachzuweisen, das entspricht einer Reduktion um etwa 2,5 logarithmischen Einheiten. Wenn man diese Reduktion auch für das *ex vivo* Lungenmodell annimmt, wäre es sinnvoll, die zur Injektion eingesetzte Bakterienzahl auf 10^7 CFU/ml zu erhöhen. Außerdem, um auch für das *ex vivo* Lungeninfektionsmodell einen „Startwert“ zu erhalten und somit die tatsächliche Replikation feststellen zu können, sollte die CFU/ml nach der zweistündigen Infektion und der einstündigen Gentamicin-Behandlung bestimmt werden.

Nachdem die oben genannten Versuche abgeschlossen waren, konnte das *ex vivo* Lungeninfektionsmodell etabliert werden. Dazu wurden Infektionsversuche mit *Fth* LVS, *Fth* LVS \DeltaiglC , F-W12 und einem *Fth*-Isolat (A660) über einen Zeitraum von insgesamt 72 h durchgeführt. Das Isolat A660 wurde 2015 aus einer 84-jährigen Tularämie-Patientin mit einseitiger Pneumonie aus einer Blutkultur isoliert und in die Stammsammlung des Konsiliarlabors für Tularämie aufgenommen [217]. Für die Infektion wurden die Lungengewebestücke mit etwa 10^7 CFU/ml für 2 h infiziert, für 1 h mit Gentamicin behandelt und anschließend weiter inkubiert bzw. zum Erhalt des CFU/ml-Wertes zu Beginn des Experimentes (nach 3 h) homogenisiert und die Suspension auf Nährböden ausplattiert. Aufgrund der stark begrenzten Menge des Probenmaterials (Lungengewebe) konnten nicht immer alle Stämme für alle Zeitpunkte parallel getestet werden, da dafür insgesamt 20 Lungengewebestücke notwendig gewesen wären (jeweils vier Stücke/Stamm/Zeitpunkt und vier Kontrollstücke). Es wurde jedoch stets darauf geachtet, dass die intrazelluläre Replikationsmutante (*Fth* LVS \DeltaiglC) mitgeführt wurde, sodass eine

Kokultur ausgeschlossen werden konnte. Die erhaltenen CFU/ml Werte der jeweiligen Zeitpunkte wurden auf das Gewicht (g) des Lungengewebsstückes berechnet, wodurch sich die Einheit CFU/ml/g ergab. In Abb. 33 A ist die Zusammenfassung von insgesamt sieben *ex vivo* Lungeninfektionen dargestellt. Es ist keine Zunahme der CFU/ml/g von *Fth* LVS \DeltaiglC und F-W12 erkennbar (vgl. *Fth* LVS \DeltaiglC 3 h: $4,1 \times 10^4$ CFU/ml/g vs. 72 h: $2,3 \times 10^4$ CFU/ml/g; F-W12 3 h: $7,2 \times 10^3$ CFU/ml/g vs. 72 h: $1,3 \times 10^4$ CFU/ml/g, Abb. 33 A). Demnach persistiert der F-W12 Stamm ebenfalls im humanen Lungengewebe. Für *Fth* LVS konnte eine Zunahme der kultivierbaren Bakterien von anfänglich (nach 3 h) $3,4 \times 10^4$ CFU/ml/g auf $7,6 \times 10^5$ CFU/ml/g festgestellt werden (Abb. 33 A). Wenn das Patientenisolat A660 mit der gleichen Bakterienzahl infiziert wurde wie die anderen Stämme (10^7 CFU/ml), waren nach 3 h etwa $5,6 \times 10^5$ CFU/ml/g detektierbar (Abb. 33 A). Daher wurde der *Fth* A660 Stamm für einige Versuche mit weniger Bakterien eingesetzt (10^6 CFU/ml). In beiden Fällen war eine Zunahme der kultivierbaren Bakterien um etwa zwei logarithmische Einheiten zu verzeichnen (10^7 /ml: $5,6 \times 10^5$ CFU/ml/g [3 h] auf $2,7 \times 10^7$ CFU/ml/g [72 h]; 10^6 /ml: von $1,2 \times 10^5$ CFU/ml/g [3 h] auf $1,6 \times 10^7$ CFU/ml/g [72 h], Abb. 33 A).

Die frisch geschnittenen Lungengewebestücke wurden in einem mit Medium gefülltem Probenbecher geliefert. Dabei fiel auf, dass sich am Boden des Bechers eine relativ große Menge an Zellen befand. Die lichtmikroskopische Begutachtung ergab, dass es sich dabei vermutlich um mobile oder ausgeschwemmte Zellen (Erythrozyten, Makrophagen, Lymphozyten) handelte (Abb. 34). Um auch diese Zellen für eine Infektion mit *Francisella* verwenden zu können, wurde die Zellsuspension von den Erythrozyten befreit indem eine kurze Inkubation mit Wasser erfolgte [235]. Die daraus resultierende Zellsuspension wurden hier als „Lungendurchfluss“ bezeichnet und zu je 1×10^5 Zellen je Napf einer 24-Napfplatte ausgesät, zum Adhärenzieren für etwa 20 h inkubiert und anschließend für eine Infektion mit *Fth* LVS, *Fth* LVS \DeltaiglC , F-W12 und *Fth* A660 verwendet. Dabei wurden die Zellen mit einer MOI von 10 für 2 h infiziert und nachfolgend mit 50 µg/ml Gentamicin behandelt. Zur Bestimmung der Bakterienzahl (CFU/ml) wurden die Zellen mit Saponin lysiert und die Suspension auf Nährböden ausplattiert (Abb. 33 B). Nach einer Inkubationszeit von 72 h war eine Zunahme der kultivierbaren Bakterien von *Fth* LVS und *Fth* A660 um etwa vier bzw. drei logarithmischen Einheiten zu verzeichnen (LVS: von $1,1 \times 10^3$ CFU/ml [3 h] auf $3,2 \times 10^7$ CFU/ml [72 h]; A660: von $5,6 \times 10^3$ CFU/ml [3 h] auf $5,5 \times 10^6$ CFU/ml [72 h], Abb. 33 B). Im Gegensatz dazu blieb die Anzahl der CFU/ml von LVS \DeltaiglC und F-W12 relativ konstant (LVS \DeltaiglC : 1×10^3 CFU/ml [3 h] und

4×10^3 CFU/ml [72 h]; F-W12: $3,9 \times 10^2$ CFU/ml [3 h] und $4,6 \times 10^2$ CFU/ml [72 h], Abb. 33 B). Der Infektionsverlauf des Lungendurchflusses wurde mithilfe von *Fth* LVS pMP814-*gfp* mikroskopisch verfolgt (Abb. 34 C).

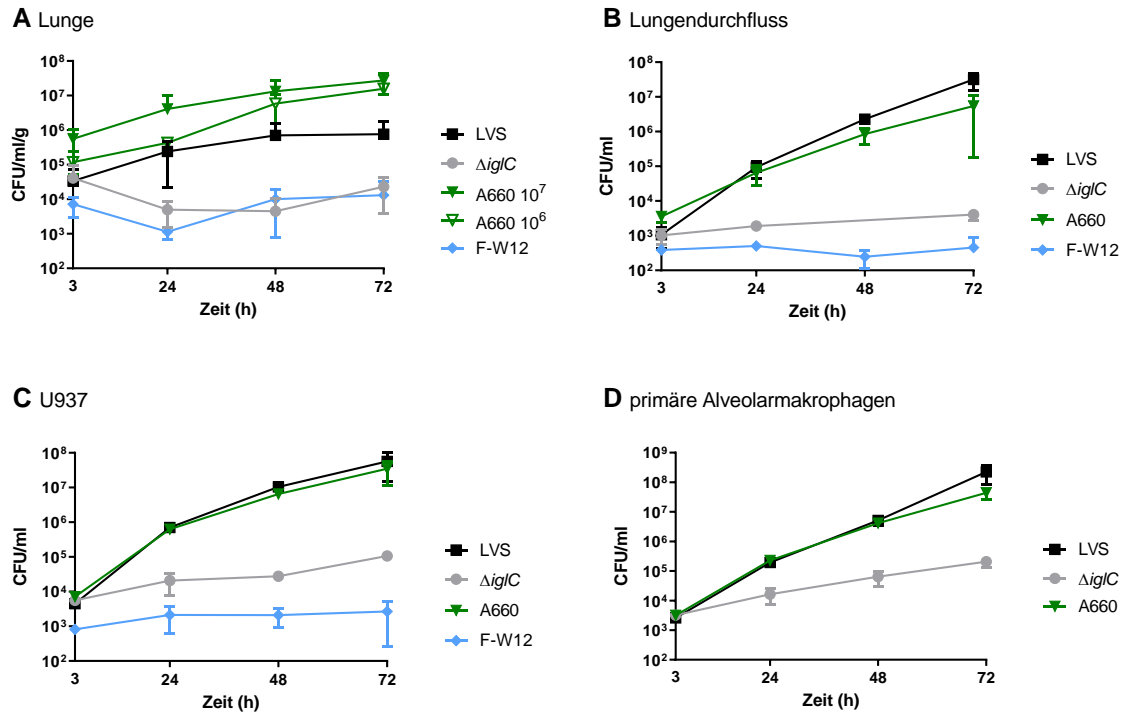


Abb. 33: Infektion vom humanen Lungengewebe (A), dem Lungendurchfluss (B), der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 (C) und der primären humanen Alveolarmakrophagen (D) mit *Fth* LVS (LVS), *Fth* LVS \DeltaiglC (\DeltaiglC), *Fth* Patientenisolat A660 (A660) und F-W12. A: Das Lungengewebe wurde mit 10^7 CFU/ml Bakterien für 2 h infiziert (Ausnahme A660 mit 10^6 CFU/ml [A660 10^6] und 10^7 CFU/ml [A660 10^7]) und anschließend mit 50 μ g/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Gewebestücke durch die Zugabe von Saponin in einer Lysing Matrix D im FastPrep homogenisiert und die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Die erhaltene Anzahl (CFU/ml) wurde auf das Gewicht des Lungengewebestücks berechnet (CFU/ml/g). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus bis zu sieben unabhängigen Versuchen. B – D: Die Zellen wurden für 2 h mit einer MOI von 10 infiziert und anschließend mit 50 μ g/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch die Zugabe von Saponin lysiert und die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) durch Ausplattieren auf Nährböden bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils technischen Duplikaten.

Da es sich bei den Zellen des Lungendurchflusses vermutlich größtenteils um ausgeschwemmte Makrophagen handelte, wurde die Makrophagen-ähnliche Zelllinie U937 und primär aus dem Lungengewebe isolierte Alveolarmakrophagen vergleichend für eine Infektion mit *Fth* LVS, *Fth* LVS \DeltaiglC , F-W12 und *Fth* A660 verwendet (Abb. 33 C, D).

Hier war ein ähnliches Bild wie bei der Infektion des Lungendurchflusses zu beobachten (Abb. 33 B, C, D). Demnach war nur eine Replikation von *Fth* LVS und *Fth* A660

erkennbar, die CFU/ml von F-W12 und *Fth* LVS Δ *iglC* blieb relativ konstant. Wobei nach 72 h der Infektion eine leichte Kokultur von *Fth* LVS Δ *iglC* auftrat, da sich die CFU/ml um etwa einer logarithmischen Einheit (bei U937) bzw. um etwa 2 logarithmische Einheiten (bei den primär isolierten Alveolarmakrophagen) erhöhte (Abb. 33 C, D).

Für den mikroskopischen Nachweis der intrazellulären Replikation von *Francisella* wurden die mit *Fth* A660-infizierten primär isolierten Makrophagen nach 48 h fixiert und mit dem Alveolarmakrophagenmarker (anti-CD68) bzw. anti-*Fth*-LPS Antikörper angefärbt. Zur Visualisierung des Zellkerns wurden DAPI verwendet. Die Färbung und die Bildaufnahme mit einem Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop wurden an der Charité, Medizinischen Klinik für Infektiologie und Pneumologie von Dr. Fatykhova der AG Hocke durchgeführt. Eine gleichzeitige Färbung der Makrophagen mit dem α -CD68 Antikörper und der *Francisella* Bakterien mit anti-*Fth*-LPS Antikörper war nicht möglich, da es sich bei beiden um einen Maus-Antikörper handelte. In Abb. 35 unten ist die Infektion und Replikation von *Fth* A660 ersichtlich (mit weißen Pfeilen markiert).

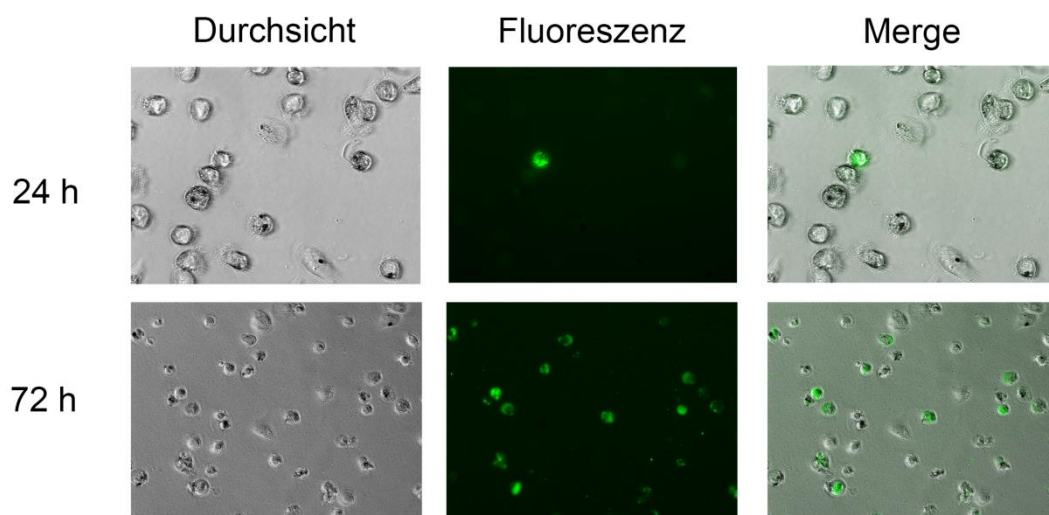


Abb. 34: Fluoreszenz-Mikroskopie des „Lungendurchfluss“ infiziert mit *Fth* LVS pMP814-*gfp*. Von den mobilen oder ausgeschwemmten Zellen aus den Lungengewebestücken wurden die Erythrozyten lysiert und die restlichen Zellen ÜN adhärirt. Anschließend erfolgte die Infektion mit *Fth* LVS pMP814-*gfp* und einer MOI von 10 für 2 h und einer Gentamicin-Behandlung für 1 h. Nach 24 h und 72 h wurden die Kulturen mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 CFL (20-iger Objektiv) mikroskopiert und mit der Olympus CAM XM10 Kamera aufgenommen.

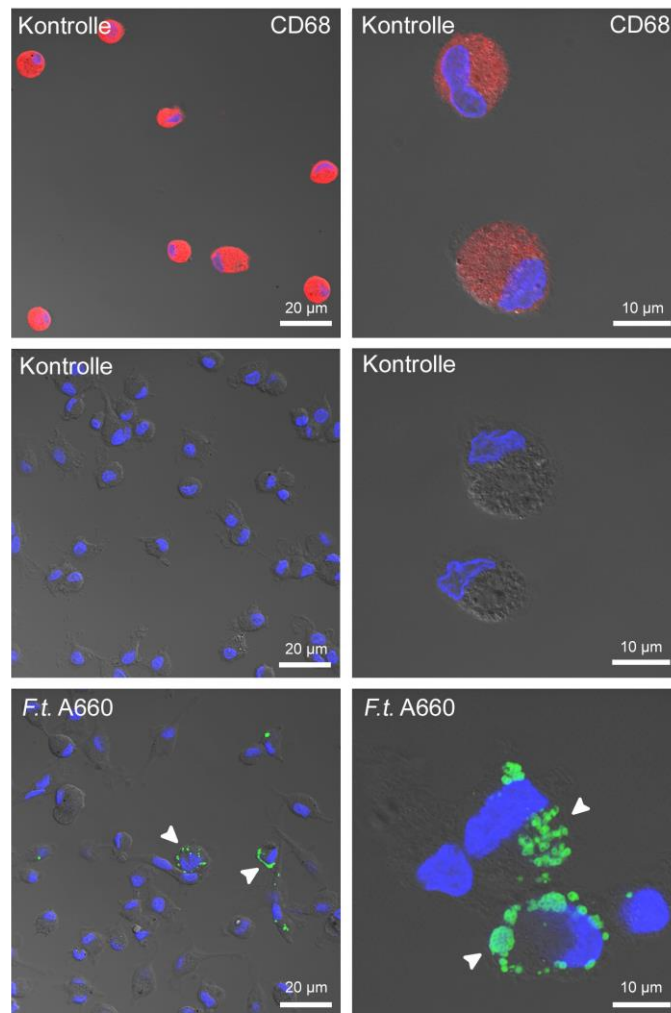


Abb. 35: Infektion von primären humanen Alveolarmakrophagen mit *Fth* A660. Die primärisolierten Zellen wurden für zwei Tage inkubiert bevor sie für 2 h mit den *Fth* Isolat A660 und einer MOI von 10 infiziert bzw. mit Medium versetzt (Kontrolle) und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt wurden. Nach 48 h der Inkubation wurden die Zellen fixiert und angefärbt mit anti-CD68 (rot, Alveolarmakrophagenmarker, oberer Streifen), anti-*Fth*-LPS (grün, mAb clon 140/11/1/6, unterer Streifen) und DAPI (blau). Die Bilder wurden mit einem Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop aufgenommen, Maßstabsbalken entsprechen 10 bzw. 20 µm. Die weißen Pfeile markieren die *Fth* A660 Bakterien. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

3. Molekularepidemiologische Studien zu *Francisella* in Deutschland

3.1. *Fth* Isolate aus den Jahren 2016 - 2018

Die hiervorliegende Doktorarbeit wurde im „Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene“ (ZBS) am Robert Koch-Institut angefertigt. Die Amtsaufgabe von ZBS2 beinhaltet unter anderem die Diagnostik und die Untersuchungen zum Vorkommen hochpathogener bakterieller Krankheitserreger in Deutschland und seit 2015 ist ZBS2 durch Prof. R. Grunow das Konsiliarlabor für Tularämie. Damit verbunden ist das

Erstellen einer *Francisella*-Stammsammlung, die epidemiologische Charakterisierung der in Deutschland gefundenen *Fth* Stämme und deren weiteren Genotypisierung. In Deutschland wurden bisher ausschließlich *Fth* Stämme aus Menschen und Tieren isoliert, bis auf eine Ausnahme – das Umweltisolat (F-W12), welches nicht zur Subspezies *Fth* gehört und einen großen Bestandteil dieser Doktorarbeit ausmacht (siehe III.1). In den Jahren zwischen 2016 und 2018 wurden insgesamt 23 *Fth* Isolate im Konsiliarlabor für Tularämie gesammelt (Abb. 36). Im Jahr 2016 wurden sechs Isolate gefunden, von denen zwei Isolate aus einem erkranktem Hasen stammen (A-988-1 *Fth* Isolat aus der Lunge und A-988-2 aus der Milz des erkrankten Tieres). Des Weiteren gab es einen außergewöhnlichen Tularämie-Ausbruch im Rahmen einer Weintraubenlese im Oktober 2016, der im nächsten Kapitel dieser Doktorarbeit näher beleuchtet wird. An dieser Stelle sei nur erwähnt, dass kein *Fth* Isolat zu diesem Ausbruchereignis gefunden wurde, sondern nur die chromosomale DNA zur Analyse herangezogen werden konnte (*Fth*-Most bzw. A-856/2/3). Teile der Ergebnisse wurden bereits in Jacob et al. 2019 und Appelt et al. 2019 publiziert [85, 217]. In den Jahren 2017 und 2018 wurden jeweils neun bzw. acht *Fth* Isolate im Konsiliarlabor für Tularämie gesammelt. In Abb. 36 sind alle *Fth* Isolate aus den Jahren 2016 bis 2018 dargestellt. Für die weitere Genotypisierung der Stämme wurde die chromosomale DNA isoliert und sequenziert. Die DNA-Quantifizierung, Library-Generierung und Sequenzierung des Gesamtgenoms wurde von der RKI-Abteilung „MF2 Genomsequenzierung“ durchgeführt [85, 217]. Die anschließende Qualitätskontrolle, das Trimmen und die Kartierung der Sequenzfragmente an das Referenzgenom (*Fth* LVS) wurden von der RKI-Abteilung „MF1 Bioinformatik“ vorgenommen. Die erhaltenen BAM-Dateien wurden weiter von mir in Geneious Version 11.1.5 prozessiert, indem die kartierten Sequenzfragmente an das Referenzgenom (*Fth* LVS) assembliert und eine Consensus-Sequenz extrahiert wurde (Grenzwert: 75 %, totale Zuordnungsqualität, Lücke wenn keine Abdeckung). Anschließend wurde ein progressives Mauve Alignment für kollineare Genome mit allen 23 *Fth* Entwurfsgenome vorgenommen ([266], Geneious Prime). Dabei fanden ebenfalls folgende Referenzgenome und Genome weitere zuvor in Deutschland isolierter Stämme Verwendung: *Fth* OSU18, *Fth* FSC162, *Fth* LVS, *Fth* FSC200, FTNF002-00, FDC407/FDC408/FDC409 und *Fth*-41 [45, 72, 157, 217, 267-271]. Ein phylogenetischer Baum (Tamura-Nei, Bootstrap-Test 100) mit *Fth* OSU18 als Außengruppe wurde mit der Neighbor-Joining Methode aus dem Mauve Alignment generiert, dieser ist in Abb. 36 einzusehen.

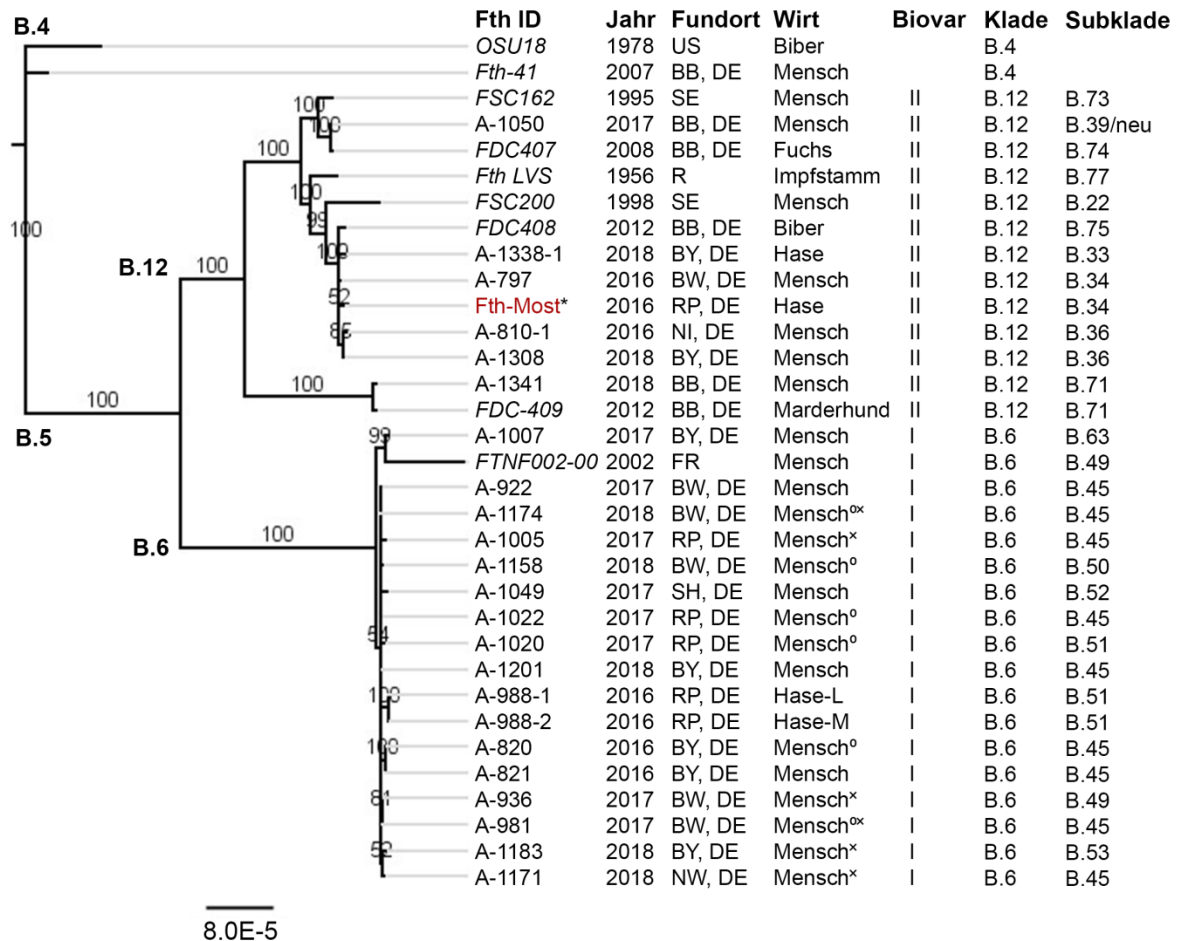


Abb. 36: Phylogenetische Verwandtschaft der *Fth* Isolate aus Deutschland. Analysiert wurde das Genom von 23 *Fth*-Isolaten (A-#, *Fth*-Most) aus Deutschland, die zwischen 2016 und 2018 im Konsiliarlabor für Tularämie gesammelt wurden. Dargestellt ist ein Neighbor-Joining Baum (Tamura-Nei, mit Bootstrap-Test 100) mit *Fth* OSC18 als Außengruppe basierend auf einem progressives Mauve Alignment ([266], Geneious Prime). In kursiv sind die Referenzgenome bzw. weitere zuvor in Deutschland isolierte *Francisella* Stämme dargestellt. Die Astlängen repräsentieren die evolutionäre Verwandtschaft, dargestellt durch den Maßstabsbalken, welcher 8E-5 Austausche pro Nukleotid angibt. Die Zahlen an den Ästen geben den Konsensus Support in Prozent an. Das Jahr, der Ort und der Wirt der *Fth* Isolate sind angegeben sowie die zugeordneten Biovar, Klade und Subklade basierend auf der canSNP-Analyse nach [44-46]. * A-856/2/3; kein Isolat, sondern nur chromosomale DNA, siehe III.3.2 und [85]; ^opulmonale Tularämie (Pneumonie); ^x mögliche Verbindung zu einem Zeckenbiss; Biovar I: Erythromycin-sensitiv; Biovar II: Erythromycin-resistent; US: Vereinigte Staaten; DE: Deutschland; R: Russland; SE: Schweden; FR: Frankreich; BB: Brandenburg; BY: Bayern; BW: Baden-Württemberg; RP: Rheinland-Pfalz; NI: Niedersachsen; SH: Schleswig-Holstein; NW: Nordrhein-Westfalen. Verändert nach Appelt et al. 2019 [217].

Die Entwurfsgenome wurden ebenfalls für die Analyse der kanonischen Single Nucleotide Polymorphismen (canSNP) verwendet, welche eine weitere Eingruppierung in Kladen und Subkladen ermöglicht [44-46]. Der phylogenetische Baum und die Klassifizierung der Isolate in die B.-Gruppen machen deutlich, dass in den Jahren 2016 - 2018 kein Vertreter der B.4 Gruppe in Deutschland gefunden wurden (Abb. 36). Einziger in Deutschland gefundene B.4 Stamm ist des Isolat *Fth*-41, welches 2007 in Brandenburg aus einem

Menschen isoliert wurde [217]. Insgesamt gehörten 16 Isolate dem B.6 Klade an, welche sich u.a. durch eine Erythromycin-Sensitivität auszeichnet (entspricht Biovar I). Sieben der 23 *Fth*-Isolate waren der Klade B.12 zuzuordnen (diese sind Erythromycin-resistent, entspricht Biovar II). Von zwölf zufällig ausgewählten Isolaten wurden die Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Erythromycin experimentell bestätigt (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der B.6 Gruppe gruppiert das Isolat A-1341, welches 2018 aus einem Jäger in Brandenburg gewonnen wurden, zusammen mit dem Referenzstamm FDC409, welcher bereits 2012 aus einem Marderhund ebenfalls in Brandenburg isoliert wurde [217]. Diese beiden Stämme scheinen weiter eine Art Zwischenform vom B.6 und B.12 Klade zu sein, da hier SNPs zu finden sind, die in B.6, aber auch in B.12 auftreten. Innerhalb der Proben waren zwei biologische Duplikate enthalten, die somit als interne Kontrolle dienten (Abb. 36). Die Isolate A-820 und A-821 stammten aus einem Patienten und wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion isoliert. Bei A-988-1 und A-988-2 handelt es sich um Isolate, die aus zwei verschiedenen Organen (A-988-1 Lunge; A-988-2 Milz) eines erkrankten Hasen gesammelt wurden. Dadurch dass diese Isolate dicht gruppieren und in Bezug auf die SNP-Analyse identisch sind, wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich. Weiter ist festzustellen, dass alle Isolate von Tularämie-Fällen, die eine mögliche Assoziation mit einem Zeckenbiss aufweisen (A-936, A-981, A-1005, A-1174, A-1183, A-1171), zu der B.6 Klade gehören. Ebenso sind die Fälle von pulmonaler Tularämie nur Isolate der B.6 Gruppe zuzuordnen (Abb. 36).

3.2. Ein ungewöhnlicher Tularämie-Ausbruch in Deutschland

3.2.1. Ausbruchsbeschreibung

Im Oktober 2016 traten vermehrt Fälle von oropharyngealer Tularämie in Rheinland-Pfalz auf [75, 85, 272]. Insgesamt erkrankten sechs Patienten, die alle Teilnehmer einer öffentlichen Traubenlese bei einem Winzer 1 waren. Dort wurden die Trauben der Sorte 1A maschinell und die Trauben der Sorte 1B manuell geerntet [272]. Beide wurden separat direkt im Anschluss gepresst und der frisch gepresste Most der Sorte 1A wurde den insgesamt 29 Teilnehmern der Traubenlese zum Verzehr angeboten. Bei einem weiteren Winzer 2 wurden am selben Tag mit der gleichen Erntemaschine (Maischewagen) wie bei der Sorte 1A die Trauben der Sorte 2C geerntet, jedoch anschließend unabhängig weiterverarbeitet und nicht zum Verzehr angeboten. Die sechs erkrankten Teilnehmer (zwei weibliche, vier männliche) zeigten nach vier bis acht Tagen nach der Lese grippeähnliche Symptome, wie Fieber, Schüttelfrost, geschwollene zervikale

Lymphknoten, Schluckbeschwerden und Durchfall. Bei allen sechs Patienten konnten Antikörper gegen das *Francisella* LPS mittels ELISA und Western Blot Analysen nachgewiesen werden [272]. Ein Patient (männlich, 46 Jahre alt) zeigte einen schweren Krankheitsverlauf über 76 Tage, welcher einen stationären Aufenthalt und eine langfristige Therapie erforderlich machte [75]. Aufgrund des langanhaltenden stark geschwollenen zervikalen Lymphknotens, wurde bei diesem Patienten eine Lymphknotenbiopsie vorgenommen. Um den Prädiktor für das Erkranken an Tularämie festzustellen, wurde retrospektiv eine Umfrage mit allen 29 Teilnehmern der Traubenlese durchgeführt. Die Umfrage mit den Teilnehmern ergab, dass das Trinken des frisch gepressten Traubenmostes während der Traubenlese der signifikante Prädiktor für das Erkranken an Tularämie war [272].

Tab. 26: Ausbruchs-assoziierte Proben und deren Ergebnisse in der RD1-PCR und der qPCR (verändert nach Burckhardt et al. 2018, Jacob et al. 2019 [85, 272])

Proben-Nr.	Beschreibung	Ergebnis qPCR (GE/ml)	Ergebnis RD1-PCR
A-856/1	Jungwein der Sorte 1B, manuell geerntet, direkt nach A-856/2 bzw./3 gepresst, Trauben wurden Teilnehmern angeboten	$4,4 \times 10^2$	<i>Fth</i> *
A-856/2	Jungwein der Sorte 1A, maschinell geerntet, frisch gepresster Most Teilnehmern angeboten	$1,7 \times 10^4$	<i>Fth</i>
A-856/3	Süßreserve der Sorte 1A, maschinell geerntet, frisch gepresster Most Teilnehmern angeboten	1×10^2	<i>Fth</i>
A-876/3	Süßreserve der Sorte 2C, später am selben Tag mit der gleichen Maschine geerntet wie A-856/2 bzw. /3	1	–
A-877	Lymphknotenmaterial eines Patienten	$1,7 \times 10^6$	<i>Fth</i>

Sorten 1A und 1B: verschiedene Traubensorten (A bzw. B) vom gleichen Winzer (1) geerntet; Sorte 2C: weitere Traubensorte (C) vom weiteren Winzer (2) geerntet; RD1-PCR: PCR zur Differenzierung der *Francisella* Subspezies mittels Amplifizierung der RD1-PCR [77]; qPCR: quantitative PCR, *Francisella* multiplex PCR mit Primern aufgelistet in [85]; GE: Genomäquivalente (*Tul4*) je ml; Berechnung mittels Plasmid des „TOPO TA Vector Cloning Kits“ (Invitrogen), siehe [85]; *Fth* * : schwach positiv

Zur weiteren retrospektiven Analyse des Vorfalls wurden im Dezember 2016 fünf Ausbruchsrelevante Proben zum Konsiliarlabor für Tularämie gesandt. Die eingegangenen Proben sind in Tab. 26 aufgelistet. Dabei handelte es sich um den Jungwein (vergorener Traubenmost durch Zugabe von Zucker und Hefe, A-856/2) und die Süßreserve (unvergoren, geschwefelter und gesüßter Traubenmost, A856/3) der Traubensorte 1A,

sowie der Jungwein der Traubensorte 1B (A-856/1) vom Winzer 1; die Süßreserve der Traubensorte 2C von Winzer 2 (A-876/3) und das Lymphknotenmaterial des Patienten mit dem schweren Krankheitsverlauf (A-877).

3.2.2. Nachweis von *Fth* DNA

Aus allen in Tab. 26 aufgelisteten Proben wurde versucht den Ausbruchsstamm zu isolieren, indem Probenmaterial in Medium T, auf *Francisella*-Nährböden (CHAB) und auf Selektiv-Nährböden (CHAB-PACCV) gegeben und für mehrere Tage bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert wurden. Es konnte jedoch kein Isolat aus den Proben gewonnen werden. Weiter wurde aus allen Proben die chromosomale DNA isoliert, welche anschließend vom Konsiliarlabor für Tularämie für eine *Ft* spezifische qPCR verwendet wurde, um gegebenenfalls *Ft* DNA in den Proben detektieren zu können. Die dafür verwendete qPCR ist spezifisch für die *Ft* Gene *tul4* und *fopA*, und dient neben dem *Ft* Nachweis auch der Quantifizierung der DNA-Menge. Somit wurden die Genomäquivalente (GE) pro ml in den einzelnen Proben ermittelt und die entsprechenden Ergebnisse sind in Tab. 26 aufgeführt. Daraus wird erkennbar, dass in den Proben der Traubensorte 1A $1,7 \times 10^4$ GE/ml (Jungwein; A-856/2) bzw. 1×10^2 GE/ml (Süßreserve; A-856/3) detektierbar waren [85, 272]. Im Jungwein der Traubensorte 1B (A-856/1) waren $4,4 \times 10^2$ GE/ml zu finden und in der Süßreserve der Traubensorte 2C (A-876/3) konnte noch 1 GE/ml nachgewiesen werden. In der Probe A-877 (Lymphknotenmaterial des Patienten) waren $1,7 \times 10^6$ GE/ml nachweisbar. Zur weiteren Charakterisierung der *Ft* Subspezies wurde anschließend die RD1-PCR durchgeführt. Diese ermöglicht die Differenzierung der *Francisella tularensis* Subspezies *holarctica* (*Fth*), *japonica* (*Ftj*), *tularensis* (*Ftt*), *mediasiatica* (*Ftm*) und der Spezies *Francisella novicida* anhand der Amplifikation der „Region of Differentiation 1“ resultierend in charakteristischen Produktgrößen [77, 85], II.2.3.8 und Abb. 37). In den Proben der Traubensorte 1A konnte im Jungwein (A-856/2, Abb. 37, Spur 2) und in der Süßreserve (A-856/3, Abb. 37, Spur 3) DNA der *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* nachgewiesen werden (Produktgröße: 924 bp, [85]). Die Probe des Jungweins der Traubensorte 1B (A-856/1, Abb. 37 Spur 1) zeigte ebenfalls eine schwache Bande der Größe von etwa 900 bp, wohingegen in der Süßreserve der Traubensorte 2C (A-876/3) keine *Francisella* DNA nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das Lymphknotenmaterial des Patienten wurde ebenfalls positiv auf *Fth*-DNA getestet (A-877, Abb. 37, Spur 15, [85]).

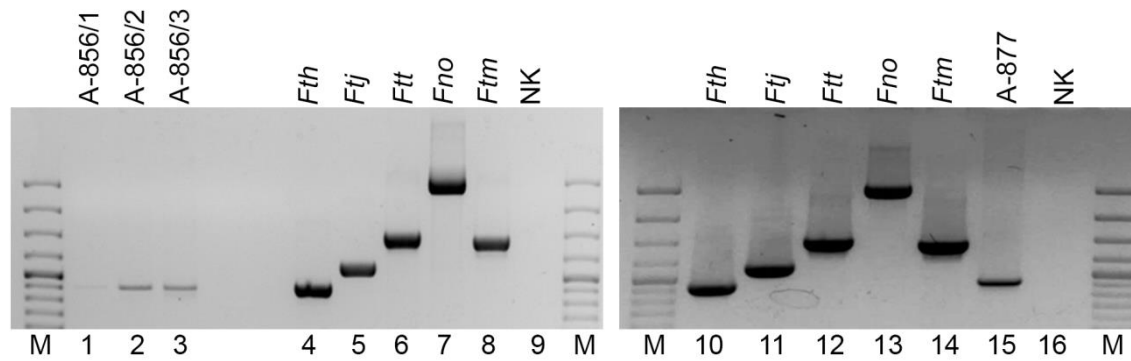


Abb. 37: RD1-PCR-Analyse der Ausbruch-assoziierten Proben. Aus den Proben A-856/1 (Jungwein der Sorte 1B), A-856/2 (Jungwein der Sorte 1A), A-856/3 (Süßreserve der Sorte 1A) und A-877 (Lymphknotenmaterial) wurde die chromosomale DNA isoliert und mithilfe der RD1-PCR analysiert. Diese dient zur Differenzierung der *Ft.* Subspezies und *F. novicida* durch spezifische PCR-Produktgrößen: *F. tularensis* ssp. *holarctica* (*Fth*) 924 bp; *F. tularensis* ssp. *japonica* (*Ftj*) 1135 bp; *F. tularensis* ssp. *tularensis* (*Ftt*) 1522 bp; *F. novicida* (*Fno*) 3322 bp; *F. tularensis* ssp. *mediasiatica* (*Ftm*) 1453 bp [77]. M: Marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder; NK: Negativkontrolle (H₂O, Spur 9, 16). Verändert nach Jacob et al. 2018 [85].

Nachdem nun der Nachweis und die Identifizierung der *Ft* Subspezies erfolgt war, sollte die Ausbruchsstamm-DNA weiter charakterisiert werden, indem eine Gesamtgenom-Sequenzierung vorgenommen wurde. Da die *Fth*-Kopienzahl in den Proben A-856/2, A-856/3 und A-877 relativ hoch waren (Tab. 26), waren diese Proben für eine Sequenzierung des Gesamtgenoms ausreichend. Für die Sequenzierung der Probe A-877 musste zunächst das Verhältnis von humaner und *Fth*-DNA betrachtet werden. Dazu wurde die Kopienzahl der Gene *tul4* (*Ft* spezifisch) und *c-myc* (humaner Transkriptionsfaktor für Zellwachstum und -differenzierung) herangezogen. Dabei wurde erkennbar, dass eine Detektion der *Ft* DNA mittels Gesamtgenomsequenzierung in der Probe möglich wäre, da das Verhältnis bei 1:15 (*Ft* : human) lag [85]. Für die Gesamtgenomsequenzierung wurde die chromosomale DNA der Proben des Jungweins (A-856/2) und der Süßreserve (A-856/3) der Sorte 1A sowie die des Lymphknotenmaterials des Patienten (A-877) verwendet. Wie im Material und Methoden Abschnitt II.2.3.11 beschrieben, wurde die Sequenzierung von der RKI-Abteilung „MF2 Genomsequenzierung“ durchgeführt und die erhaltenen Sequenzen wurden weiter von der RKI-Abteilung „MF1 Bioinformatik“ prozessiert indem sie der Qualitätskontrolle, dem Trimmen und der Kartierung unterzogen wurden. Bei der Kartierung wurden zunächst alle erhaltenen Sequenzfragmente (A-877 [Patientenmaterial]: 22.116.655; A-856/2 [Jungwein]: 27.345.303; A-856/3 [Süßreserve]: 17.931.396) gegen mögliche Begleitorganismen kartiert [85]. Das umfasste im Falle der DNA des Patientenmaterials

(A-877) das humane Genom (GRCh38), welches den größten Anteil, insgesamt 98,6 %, aller Sequenzfragmente ausmachte. Die Kartierung zum *Fth* LVS Genom ergab in der Probe A-877 nur 691 Sequenzfragmente, die insgesamt 107.073 bp des *Fth* LVS Genom abdeckten. Alle erhaltenen Sequenzfragmente des Jungweins (A-856/2: 27.345.303) und der Süßreserve (A-856/3: 17.931.396) wurden als erstes gegen das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* und anschließend gegen das Genom der Weintraube (*Vitis vinifera*) kartiert. Alle restlichen nicht-kartierten Sequenzfragmente (A-856/2 [Jungwein]: 3.674.761; A-856/3 [Süßreserve]: 17.709.501) wurden schließlich mit dem Genom von *Fth* LVS kartiert. Beim Jungwein (A-856/2) konnten 1,9 % (71.201 Sequenzfragmente) und bei der Süßreserve (A-856/3) 9,6 % (1.696.328 Sequenzfragmente) erfolgreich zum Genom von *Fth* LVS kartiert werden. Die zum *Fth* LVS Genom kartierten Sequenzfragmente der Süßreserve (A-856/3) wurden genutzt um eine Consensus-Sequenz und ein sogenanntes Entwurfsgenom „*Fth* Most“ zu generieren, welches 1.895.952 bp umfasste. Die zum *Fth* LVS-Genom kartierten Sequenzfragmente der Süßreserve besaßen eine durchschnittliche Länge von 187 ± 53 bp mit einer durchschnittlichen Abdeckung von 167 Sequenzfragmenten und sind gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt. Das Entwurfsgenom „*Fth*-Most“ wurde dann weiter verwendet, um die phylogenetische Verwandtschaft mit bereits bekannten Isolaten aus Deutschland zu vergleichen (siehe oben, [85, 217]). Weitere Genomanalysen basierend auf das canSNP Analyse-Schemas [44-46] zeigten, dass der *Fth* Most Stamm zum Biovar II bzw. B.12 Klade (umfasst die Erythromycin-resistenten Stämme) und weiterführend zum Subklade B.34 zuzuordnen ist (Abb. 36). Damit gruppiert es mit anderen Isolaten A-1338-1, A-797, A-810-1, A-1308, die in Bayern, Baden-Württemberg und Niedersachsen aus Patientenproben isoliert wurden, und mit dem *Fth*-Stamm FDC408, welcher aus einem Biber in Brandenburg isoliert wurde (Abb. 36). Die sonst in Rheinland-Pfalz gefundenen Stämme gehören der B.6 Gruppe an. Beim Versuch die *Fth* DNA aus dem Patientenmaterial (A-877) weiter zu klassifizieren, wurden alle nicht-humanen Sequenzfragmenten zum Entwurfsgenom „*Fth* Most“ kartiert. Dabei wurden 690 Sequenzfragmente gefunden (zum Vergleich: 961 Sequenzfragmente wurden erfolgreich mit dem *Fth* LVS Genom kartiert, siehe oben, [85]). Bei der weiteren canSNPs Analyse der A-877 *Fth* DNA wurde ein Sequenzfragment gefunden, welches repräsentativ für die B.12 Gruppe ist, und zwei weitere, die zwei B.33-spezifische SNPs abdeckten. Nach Karlsson et al. kann die Zuordnung zur Erythromycin-resistenten *Ft* Gruppe (B.12) ebenfalls durch spezifische SNPs in den drei Kopien des *rrl* Gens in *Ft* erfolgen [48]. In der *Fth* DNA der Patientenprobe A-877 wurden drei Sequenzfragmente

gefunden, die zwei Kopien des *rrl* Gens abdeckten. Weiter wurde hier das spezifische SNP für die Erythromycinresistenz nachgewiesen (A2059C). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der *Fth* DNA aus dem Lymphknotenmaterial des Patienten ebenfalls um einen Vertreter der B.12 Gruppe (sowie evtl. B.33) handelte. Nichtsdestotrotz war eine genauere Klassifizierung der *Fth*-DNA der Probe A-877 nicht möglich, da die Abdeckung mit den *Fth* LVS bzw. mit dem *Fth*-Most Genom zu gering war.

3.2.3. Identifikation der Kontaminationsquelle

Nachdem der Krankheitserreger identifiziert wurde, sollte weiter nach der möglichen Kontaminationsquelle gesucht werden. Nach Angaben von Winzern werden gelegentlich kleine Nagetiere oder Ähnliches bei der maschinellen Traubenlese mitgeerntet. Daher wurde als erstes in den Sequenzfragmenten der Süßreserve (A-856/3), die nicht mit dem Hefe-, Weintrauben- und *Fth* LVS Genom kartierten, nach Sequenzfragmente spezifisch für das Maus Genom (*Mus musculus*) gesucht. Insgesamt konnten 2.600 bp Sequenzfragmente zum Mausgenom kartiert werden, jedoch war eine weitere Identifikation der Spezies nicht möglich [85]. Daher wurden alle Ausbruch-assoziierten Proben (A-856/1/2/3) in einer PCR spezifisch für die Detektion des mitochondrialen Cytochrom b Gens von Vertebraten untersucht. Das Primerpaar UNFOR403 und UNREV1025 generiert ein PCR-Produkt der Größe 623 bp und wurde ursprünglich für die Identifikation der Säugetierwirte von blutsaugenden Moskitos entwickelt [222].

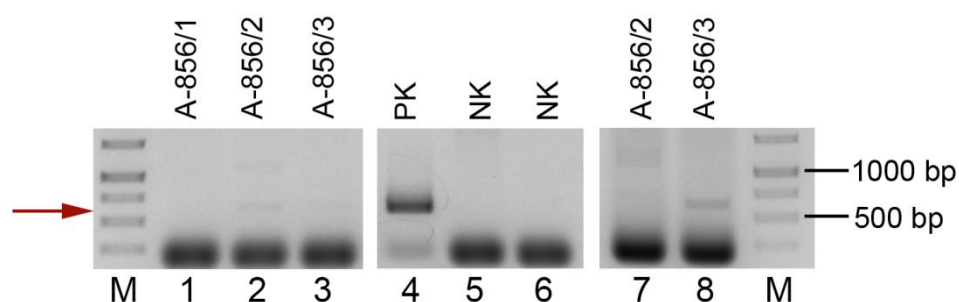


Abb. 38: Nachweis des vertebralen Cytochrom b in den Ausbruch-assoziierten Proben. Die isolierte chromosomale DNA der Proben des Jungweines der Sorte 1B (A-856/1) und des Jungweins (A-856/2) und der Süßreserve (A-856/3) der Sorte 1A wurden in einer PCR mit den Primern UNFOR403 und UNREV1025 verwendet. Die Primer detektieren spezifisch das Cytochrom b Gen von Vertebraten und generieren ein PCR-Produkt der Größe 623 bp [222], welches durch den roten Pfeil angezeigt wird. Schafblut diente als Positivkontrolle (PK) und als Negativkontrollen (NK) wurden die DNA von F-W12 (Spur 5) und Wasser (Spur 6) verwendet. M: Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Verändert nach Jacob et al. 2019 [85].

Mithilfe dieser PCR konnte in den Proben des Jungweins (A-856/2; Abb. 38, Spur 2 und 7) und der Süßreserve (A-856/3; Abb. 38, Spur 3 und 8) der Traubensorte 1A ein PCR-Produkt der Größe etwa 630 bp nachgewiesen werden [85]. Im Gegensatz dazu war der Jungwein der Sorte 1B (A-856/1; Abb. 38, Spur 3) negativ für das vertebrale Cytochrom b Gen. Die mit UNFOR403 und UNREV1025 amplifizierten PCR-Produkte (623 bp) des Jungweins (A-856/2) und der Süßreserve (A-856/3) wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten, vereint und gereinigt. Anschließend wurde das gereinigte PCR-Produkt in den pGEM Teasy Vektor kloniert und in *E. coli* transformiert. Von 10 *E. coli* Klonen wurden die Plasmide isoliert und das Insert sequenziert. Aus den erhaltenen Sequenzen wurde eine Consensus-Sequenz erstellt und eine vorläufige BLAST-Analyse ergab, dass die Insert-DNA-Sequenz dem Cytochrom b der *Apodemus* Gruppe zuzuordnen ist. Daraufhin wurde die Insert-DNA mit den Cytochrom b Genen verschiedener *Apodemus* Spezies verglichen. Das mittels UNFOR403 und UNREV1025 amplifizierte PCR-Produkt abzüglich der Primer besaß eine Größe von 578 bp und wurde in einem MAFFT-Alignment mit den Cytochrom b Genen von *M. musculus*, *A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* sowie *A. sylvaticus* Haplotyp Germany-1 bzw. -2 weiter untersucht (Abb. 39). Hier wurde erkennbar, dass die Insert-DNA-Sequenz zu 99,8 % identisch mit dem Cytochrom b Gen von *A. sylvaticus* (Waldmaus) Haplotyp Germany-1 (bzw. *A. sylvaticus* Haplotyp France) war. Nur an der Position 279 war in der Insert-DNA-Sequenz ein R (A oder G, „anstatt“ A) zu finden. Generell sind die Cytochrom b Gene innerhalb der *Apodemus* Familie stark konserviert, die Haplotypen Germany-1 und -2 von *A. sylvaticus* unterscheiden sich nur in einem SNP an der Position 329 (Germany-1: T; Germany-2: C). Zusammenfassend lässt sich folgendes hypothetisches Kontaminationsszenario erstellen: Eine mit *Fth* infizierte Waldmaus wurde während der maschinellen Traubenlese der Sorte 1A mitgeerntet, gepresst und kontaminierte dadurch den Traubenmost mit *Ft* Bakterien. Durch den Verzehr des Mostes kam es zu einer Übertragung von *Ft* Bakterien auf den Menschen [85, 272].

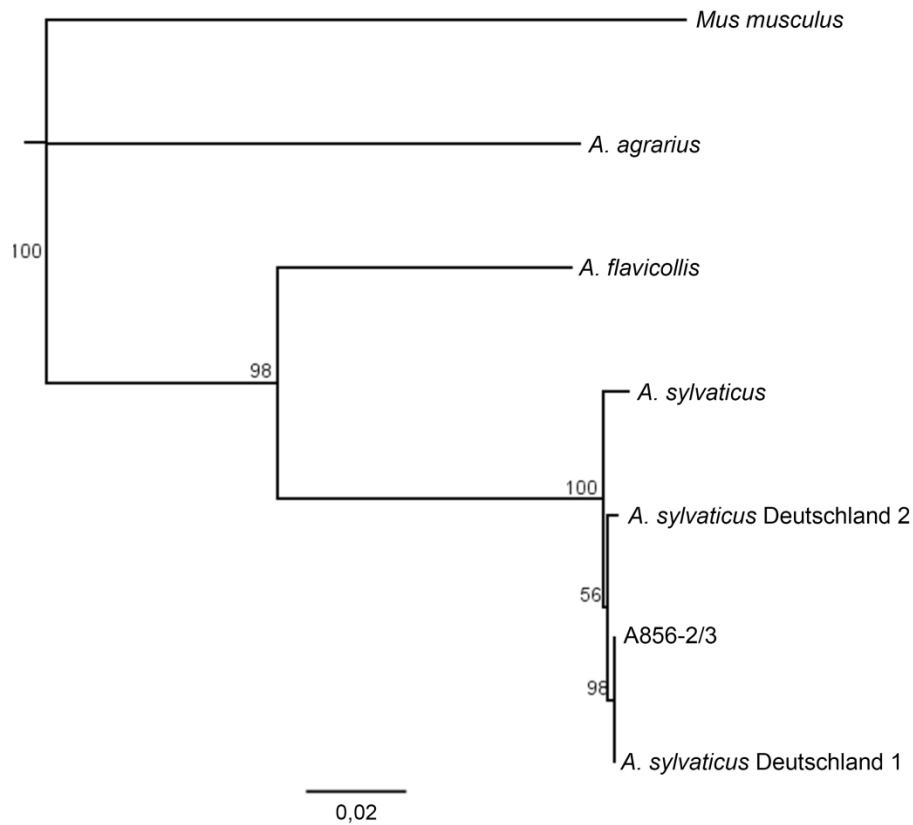


Abb. 39: Phylogenetische Verwandtschaft verschiedener Cytochrom b Gene. Analysiert wurde die 578 bp große PCR-Sequenz des Jungweines und Süßreserve (A-856/2/3) sowie die Cytochrom b Gene von *Mus musculus*, *A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus* sowie *A. sylvaticus* Haplotyp Germany_1 und Haplotyp Germany_2. Dargestellt ist ein Neighbor-Joining Baum (Tamura-Nei, mit Bootstrap-Test 100) mit *Mus musculus* als Außengruppe basierend auf einem MAFFT Alignment. Die Astlängen repräsentieren die evolutionäre Verwandtschaft, dargestellt durch den Maßstabsbalken, welcher 0,02 Austausche pro Nukleotid angibt. Die Zahlen an den Ästen geben den Konsensus Support in Prozent an. Der Sequenzabgleich ist im Anhang einzusehen. Verändert nach Jacob et al. 2019 [85].

IV. Diskussion

1. Charakterisierung des neues *Francisella* Isolates W12-1067

Das erst kürzlich identifizierte aquatische Umweltisolat F-W12 gehört nicht zu *Ft* und auch nicht zur Subspezies *Fth* und stellt damit die zweite in Deutschland gefundene *Francisella* Spezies dar [165]. Es ist mit weiteren aquatischen *Allofrancisella* Stämmen aus China nah verwandt [11, 165, 167]. Die FPI konnte *in silico* nicht im Genom von F-W12 gefunden werden, jedoch wurden einige putative *Francisella*-spezifischen Virulenzgene und zwei Genominseln identifiziert, die Ähnlichkeiten zur FPI aufweisen und für ein alternatives T6SS kodieren könnten. Für die vollständige Bewertung der Pathogenitätsfähigkeit des Isolates und der damit verbundenen Risikoabschätzung für den Menschen sollte im Rahmen dieser Arbeit eine weiterführende Charakterisierung des F-W12 Isolats vorgenommen werden. Diese beinhaltete die Untersuchungen hinsichtlich des Replikationsvermögens in potentiellen Wirtszellen (als Habitat oder als Wirt), die Analyse des alternativen T6SS und die experimentelle Identifizierung von Fitness- und Virulenzfaktoren.

1.1. Suche nach einer potentiellen Wirtszelle

Wie bereits Rydzewski und Kollegen zeigten, ist das Umweltisolat F-W12 in der Lage humane und murine Makrophagen *in vitro* zu infizieren [165]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuche machten dennoch deutlich, dass weder humane noch murine Makrophagen „echte“ Wirtszellen für F-W12 darstellen, da keine Replikation nachzuweisen war (Abb. 8). Damit unterscheidet sich der F-W12 Stamm grundlegend von *Ft*, denn diese nutzen primär Makrophagen für die intrazelluläre Replikation während einer Infektion [110]. Nichtsdestotrotz persistiert das F-W12 Isolat in den Makrophagen und somit scheint es sich gegen die intraphagozytäre Abtötung behaupten zu können, bereits das kann zur Pathogenität eines Keims beitragen. Ob der W-12 Stamm, wie *Ft* den Phagosomreifungsprozess inhibiert und die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite im Phagosom verhindert oder andere Abwehrmechanismen nutzt, ist unklar [116-119]. *Ft* infiziert neben den klassischen phagozytierenden Zellen auch nicht-phagozytierende Zellen, z.B. konnte *in vitro* und *in vivo* eine Replikation in den Alveolarepithelzellen des Typ II (ATII) festgestellt werden [95, 240, 241]. In diesem Fall wird die *Ft* Internalisierung ausschließlich durch die ATII Wirtszelle vollzogen, da lebende und Paraformaldehyd-fixierte Bakterien gleichermaßen phagozytiert werden [95].

Zusätzlich ist nur eine geringe *Francisella* Adhärenz (0,5 %) und Invasion (0,2 %) für ATII Zellen beschrieben [112, 240]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der F-W12 Stamm ebenso nur mit einer geringen Invasionsrate von den A549 Zellen internalisiert wurde (0,1 %, Abb. 8). Im Gegensatz zu *Francisella* war der F-W12 Stamm nicht in der Lage sich in den A549 Zellen zu vermehren, dennoch persistierte der Stamm auch hier über den gesamten Versuchszeitraum.

Um die Pathogenität für den F-W12 Stamm auf andere potentielle Wirtsorganismen bzw. -zellen zu untersuchen, wurden Infektionsversuche mit den Hühnermakrophagen-ähnlichen Zellen (HD11) durchgeführt (Abb. 8). Für andere intrazelluläre Pathogene, wie z.B. *Listeria monocytogenes* und *Salmonella*, konnte bereits eine *in vitro* Invasion und Replikation in den DH11 gezeigt werden [273, 274]. Im Gegensatz dazu repliziert der F-W12 Stamm nicht intrazellulär in den HD11 Zellen, aber er persistiert und vermehrt sich extrazellulär (Abb. 8). Eine Kokultur von F-W12 und eukaryotischen Zellen wurde zuvor noch nicht beobachtet. Die Persistenz und die Vermehrung in Kokultur von F-W12 waren temperaturabhängig. Wurde die Inkubationstemperatur auf die Körpertemperatur eines Huhnes angehoben (42 °C), war der F-W12 Stamm nach 72 h nicht mehr nachzuweisen. Wie bereits Rydzewski et al. zeigte, besitzt F-W12 eine optimale Wachstumstemperatur zwischen 30 - 37 °C, höhere Temperaturen verträgt er nicht [165]. Da es sich beim F-W12 Stamm um ein aquatisches Umweltisolat handelt, ist es naheliegend, dass dieser eher „niedrigere Umwelttemperaturen“ toleriert. In der Literatur sind *Francisella* Replikationsstudien bisher nur mit Hühnerembryonen dokumentiert, nicht hingegen mit der HD11-Zelllinie [180, 275]. In der Umwelt werden darüber hinaus nur vereinzelt Tularämie-Fälle in Wildvögeln registriert, was die geringe Bedeutung von Vögeln als *Ft* Reservoir aufzeigt [50].

Neben den Vertebraten-Zelllinien wurden auch Amöben als potentielle Wirtszelle von F-W12 getestet. *D. discoideum* ist beispielsweise als Infektionsmodell für aquatische *F. noatunensis* ssp. *noatunensis* und andere intrazelluläre Pathogene (*L. pneumophila*, *P. aeruginosa*) etabliert, jedoch wird es nicht für Replikationsstudien für *Ft* verwendet [246, 247, 276]. Für das Umweltisolat F-12 stellt *D. discoideum* keine potentielle Wirtszelle dar, da keine Replikation festgestellt werden konnte (Abb. 9), stattdessen nahm die Anzahl der kultivierbaren Bakterien während des Versuchsverlaufs ab. Im Gegensatz dazu konnte eine Persistenz von F-W12 in *A. lenticulata* über einen Zeitraum von zehn Tagen beobachtet werden (Abb. 9). Generell ist eine Infektion und Kokultur von *Francisella* mit verschiedenen Amöbe, wie z.B. *A. castellanii* und *Hartmanella*

vermiformis, beschrieben [242-245, 248]. Daher und aufgrund der relativ stabilen Persistenz des F-W12 Stammes in den Amöben wurde in dieser Arbeit ein Testverfahren mit *A. lenticulata* entwickelt (Scatterscreen), um potentielle Virulenz- und Fitnessfaktoren von F-W12 identifiziert zu können (siehe unten).

Bisher konnte keine Wirtszelle für eine intrazelluläre Replikation für den Umweltstamm F-W12 identifiziert werden, dennoch verfügt F-W12 über Mechanismen, die die intrazelluläre Abtötung durch Makrophagen, ATII Zellen und Amöben verhindern. Diese heißt es näher zu charakterisieren, um die vom F-W12 ausgehende Pathogenität einschätzen zu können. Dazu sollte weiter nach möglichen Wirtszellen für den F-W12 Stamm gesucht werden. Einerseits könnte die Replikationsfähigkeit von F-W12 in Insekten *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Die *Drosophila*-Zelllinie S2 beispielsweise wurde bereits erfolgreich für die Identifizierung von *Francisella* Virulenzfaktoren und Replikationsstudien verwendet [208, 212, 277, 278]. Ebenso wurde *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus für *Ft* etabliert [279]. Opportunistische und avirulente *Francisella* Stämme besitzen darüber hinaus eine größere Pathogenität und Virulenz in der Larve der Großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) als humanpathogenen *Ft* Stämme [280, 281]. Demnach wäre die *G. mellonella* Larve ebenfalls ein geeigneter Kandidat für weitere Infektionsstudien mit F-W12. Des Weiteren sind Protisten-assoziierte *Francisella* Arten beschrieben. *F. endociliophora* wurde beispielsweise aus dem Wimpertierchen *Euplotes raikovi* isoliert und *F. adeliensis* aus *E. petzi* [12, 13, 282]. Diese beiden *Francisella* Arten besitzen eine durchschnittliche Nukleotid-Identität von 77 - 78 % mit *A. guangzhouensis*, welches wiederum eine 99 % Sequenzidentität der 16S rDNA mit F-W12 aufweist [13, 165]. F-W12, *F. endociliophora* und *F. adeliensis* sind somit phylogenetisch nicht weit voneinander entfernt und daher wäre ein Infektionstest mit *Euplotes* sp. und F-W12 ebenfalls sinnvoll. Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* wird zur Analyse von vielen gramnegativen Pathogenen, u.a. *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* und *P. aeruginosa* verwendet [283-287]. In Zusammenhang mit *Francisella* wurde *C. elegans* bisher vorrangig für die Evaluation von therapeutischen Stoffen genutzt, trotzdem wäre es als ein weiteres potentiell Infektionsmodell für F-W12 denkbar [288]. Die fischpathogenen *Francisella* Arten, (z.B. *F. noatunensis*) weisen zwar relativ große phylogenetische Unterschiede zu F-W12 auf [165], gleichwohl wäre eine Infektion, z.B. mit *Oreochromis* sp. oder *Danio rerio* (Zebrafisch), für eine umfangreiche Charakterisierung des F-W12 Stammes sinnvoll. Bei der weiteren Suche nach einer geeigneten Wirtszelle oder eines Reservoir für F-W12 gilt es primär Zellen oder

Organismen zu verwenden, die im Zusammenhang mit dem potentiellen natürlichen aquatischen Habitat von F-W12 stehen könnten. Generell ist das natürliche Reservoir von *Francisella* in der Umwelt noch nicht bekannt. Für die Identifikation des *Francisella* Reservoirs werden in unserer Arbeitsgruppe Mikrosom-Experimente durchgeführt. Das F-W12 Isolat könnte ebenso Bestandteil eines natürlichen Biofilms sein und daher wären auch für F-W12 Mikrosom-Untersuchungen mit verschiedenen Biofilmbildnern und Biofilm-assoziierten Eukaryoten (z.B. Protozoen, Milben, Insektenlarven etc.) hilfreich.

1.2. Alternatives Typ-VI-Sekretionssystem

Wie in der Einleitung I.5 beschrieben, wurden im F-W12 Genom zwei Gencluster gefunden, die Ähnlichkeiten zu der FPI aufweisen und somit für ein putatives alternatives T6SS kodieren könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genprodukte von *peg.957* (OrfE, IglC_{W12}) und *peg.950* (OrfD1, VgrG_{W12}) näher untersucht.

Das OrfE Protein verfügt über keine bekannte Signaldomäne und besitzt eine geringe Proteinidentität mit IglC von *Fth* und *Fno*, jedoch besitzt es eine relativ große Ähnlichkeit mit dem ORF *FTN_0044*, welches auf einer zweiten im Genom von *Fno* gefundenen Insel kodiert (*FTN_0037* - *FTN_0054*, siehe Abb. 5, Tab. 20, [164, 183]). Diese zweite *Fno* Insel ist noch wenig charakterisiert, jedoch sind hier einige ORFs mit relativ großen Ähnlichkeiten zu T6SS-Komponenten zu finden, dazu zählen beispielsweise Homologe zu IglA, IglB, PdpB und DotU (Abb. 5, [164, 183]). Nichtsdestotrotz scheint diese Insel nicht für die intrazelluläre Replikation von *Fno* in murinen Makrophagen notwendig zu sein, eine Δ *FTN_0037* - *FTN_0054* Deletionsmutante zeigte keinen *in vitro* und *in vivo* Replikationsdefekt [183]. Unabhängig davon, weist das *FTN_0044* Gen Ähnlichkeiten zum FPI-Gen *iglC* auf und wurde bereits als notwendig für die Replikation in der *Drosophila* Zelllinie S2 identifiziert [213]. Für die Vermehrung in humanen Makrophagen (U937) und in adulten Fruchtfliegen war es hingegen nicht erforderlich. Die genaue Funktion von *FTN_0044* in *Fno* ist noch völlig unklar. Trotz der Ähnlichkeit zur T6SS-Komponente IglC scheint es nicht die gleiche Aufgabe auszuführen, denn eine *iglC*-Deletion in *Fno* führt zum intrazellulären Replikationsdefekt der Mutante, somit kompensiert *FTN_0044* nicht das fehlende *iglC* [161]. Generell ist das *Francisella* IglC Protein einzigartig innerhalb gramnegativer Bakterien, da es keine bekannte Signaldomäne exprimiert und kein Homolog in anderen Bakterien existiert [132, 194]. Innerhalb von *Francisella* ist es relativ stark konserviert. Obwohl Sequenzhomologien fehlen, konnten Strukturhomologien mit dem Hcp (TssD) Protein kanonischer T6SS nachgewiesen werden

[194]. Es wird angenommen, dass das IglC den T6SS-Tubulus in *Francisella* bildet und für die Penetration der Membran mitverantwortlich ist [169, 194]. Für die T6SS-Funktionsweise ist IglC essentiell, da *iglC*-Deletionsmutanten während der intrazellulären Phase das Phagosom nicht verlassen und sich somit nicht im Zytosol vermehren können [122, 171, 249, 251].

Ebenso wie das OrfE (IglC_{W12}) nur eine geringe Identität mit dem *Ft* IglC aufweist, besitzen OrfD1 (VgrG_{W12}) nur geringe Ähnlichkeit zu VgrG von *Fth* und *Fno* (Tab. 21). Auch für OrfD1 konnten keine beschriebenen Signaldomänen identifiziert werden, jedoch ist die Proteinidentität von OrfD1 zur zweiten in *Fno* gefunden Insel größer (*FTN_0038*). *FTN_0038* wurde ebenfalls als essentiell für die intrazelluläre Replikation in der *Drosophila* Zelllinie S2 identifiziert (Abb. 5, [213]). Im Gegensatz zu *FTN_0044* war die *FTN_0038::Tn* Mutante ebenfalls in humanen Makrophagen und in adulten Fruchtfliegen attenuiert. Welche Funktion *FTN_0038* in der Wirt-Pathogen-Interaktion von *Fno* ausübt, ist nicht bekannt. Darüber hinaus konnte nur eine geringe Proteinidentität zwischen *FTN_0038* und VgrG von *Fno* nachgewiesen werden (Tab. 21). Generell, besitzt das *Francisella* VgrG nur eine geringe Sequenz- und Strukturhomologie zu kanonischen VgrG Proteinen und ist deutlich verkürzt [170]. Die genaue Funktion von VgrG in *Francisella* ist nicht ganz verstanden, da es einerseits als sekretiertes Effektorprotein und andererseits als Bestandteil der T6SS-Struktur (es bildet die penetrationsfähigen Spitze) angesehen wird [125, 132, 170, 171]. Ebenso koordiniert es die Sekretion von anderen potentiellen T6SS-Effektoren [125, 170, 181-183]. Ähnlich wie *Ft iglC* Mutanten sind auch *vgrG*-Deletionsmutanten *in vitro* und *in vivo* avirulent. Auch sie können das Phagosom nicht verlassen und demnach nicht im Zytosol der Wirtszelle replizieren [171].

Darüber hinaus existieren ebenfalls in den aquatischen *Allofrancisella* Isolaten, z.B. in *A. guangzhouensis*, *A. inopinata*, aus China FPI-ähnliche Genominseln [165]. Allerdings sind diese Stämme noch wenig erforscht [11, 166, 167]. Die beiden in F-W12 identifizierten Genominseln scheinen nicht auf einem Duplikationsereignis zurückzuführen zu sein, wie es für die zwei Kopien der FPI in den *Ft* Subspezies angenommen wird [164]. Die Sequenz- und Proteinidentitäten zwischen den Genclustern in F-W12 sind relativ klein (14 % bzw. 20 % für OrfE bzw. OrfD1, Tab. 20, Tab. 21). Die Relation der beiden Inseln zu einander wäre vergleichbar mit der FPI und der FPI-ähnlichen Genominsel in *Fno*. Auch diese beiden Gencluster weisen größere Nukleotidunterschiede auf.

1.2.1. Generierung und Komplementierung der Deletionsmutanten

Die genetische Manipulation von *Francisella* gestaltet sich im Vergleich zu klassischen Modellorganismen wie z.B. *E. coli* als etwas komplexer [122, 161]. Für *Fth* LVS wird eine geringe Rekombinationsrate mit zumeist einzelnen Rekombinationsereignissen angenommen [122]. Nichtsdestotrotz sind verschiedenste Methoden zur Mutagenese in *Francisella* beschrieben, u.a. die chemische Transformation, Elektroporation, die Kryotransformation und die Konjugation [289]. In einigen *Francisella* Spezies wurden von unserer Arbeitsgruppe zusätzlich aktive CRISPR-Cas Systeme gefunden [290]. Beispielsweise verfügt *Fno* U112 über zwei solcher aktiven Systeme, was die Transformation mit Fremd-DNA erschweren kann. Hingegen weisen die *Ftt*, *Fth* und *Ft* ssp. *mediasiatica* vermutlich nur ein funktionsloses CRISPR-Cas Gen auf [290]. Im F-W12 Stamm wurde keine Genomregion mit putativer CRISPR-Cas Funktion identifiziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der F-W12 Stamm über eine natürliche Kompetenz verfügt, was die Aufnahme von Fremd-DNA aus der Umwelt und die natürliche Transformation ermöglichte. Wie bereits für andere Bakterien beschrieben, kann der Zustand der Kompetenz durch veränderte Kulturbedingungen induziert werden. In *L. pneumophila* wird beispielsweise die Kompetenz durch eine Temperaturabsenkung auf 30 °C begünstigt [291-293]. Für den F-W12 Stamm wurde beobachtet, dass ebenfalls eine Temperaturabsenkung auf 30 °C die Anzahl der Transformanten erhöhte, aber nicht essentiell für die Kompetenz und die natürliche Rekombination war. Für den F-W12 Stamm sind die Kompetenzmechanismen und -faktoren noch nicht bekannt. Generell ist die Fähigkeit der Kompetenz gerade für Umweltbakterien vorteilhaft, da dadurch eine Anpassung an die schnell verändernden Umweltbedingungen gewährleistet wird, z.B. durch die Aufnahme von Virulenzgenen oder Genen für neue Stoffwechselwege. Mithilfe der neu entdeckten Kompetenz und der natürlichen Transformation konnten verschiedene Deletionsmutanten des alternativen T6SS im F-W12 generiert werden (siehe III.1.2.1).

Für *in trans* Komplementierungen wurde in dieser Arbeit der Integrationsvektor pFIV2-Val verwendet [214]. Der Vektor beruht auf einem pUC57-kana Vektor, verfügt über eine ortsspezifische Integrase (FN3523_1033) sowie *attL*-/ *attR*-Stellen und nutzt die tRNA-Val als Integrationsort. Somit liegt der FIV2-Teil entweder integriert im Chromosom oder als episomale Ringform in *Francisella* vor (Abb. 13, Abb. 14). Das pUC57-kana-Vektorrückgrat geht verloren, was durch die negative Selektion des darauf liegende *sacB* Gens begünstigt wird. Das *sacB* Gen stammt aus *Bacillus subtilis* und kodiert für eine Levansucrase, die in Anwesenheit von Sucrose auf gramnegative Bakterien toxisch wirkt

[214, 294], dadurch sind nur die Transformanten vermehrungsfähig, die den pUC57-Teil verloren haben. Ein entscheidender Vorteil des pFIV2-Val ist die Anwendbarkeit für viele *Francisella* Spezies, da der tRNA-Val-Integrationsort innerhalb *Francisella* konserviert ist. Wie Tlapák et al. und diese Arbeit zeigen, ist FIPV2-Val u.a. für die Verwendung in *Fth* LVS, *Fno* U112 und den F-W12 Stamm geeignet [214]. Darüber hinaus ist der FIV2-Val Vektor auch ohne Selektionsdruck stabil in *Francisella* (Abb. 13), wodurch er besonders für lange Versuche, wie z.B. Infektionen und Konkurrenz-Assays, geeignet ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass FIV2-Val in 3,6 Kopien pro *Francisella* Zelle vorliegt und somit zu den „Low-Copy-Plasmiden“ zählt [214]. Der pFIV1-Val ist die Vorstufe des pFIV2-Val und beide unterscheiden sich nur minimal. pFIV1-Val besitzt ein *gfp* Gen im FIV-Val Teil, jedoch fehlt das *sacB* Gen im pUC57-kana Teil. Die FPIV-Val Plasmide verfügt über den *Francisella* Promotor GroES (*Fth* LVS, [295]), dem *iglA* Promotor mit PigR Response-Element (PRE, reguliert die Genexpression während der intrazellulären Replikation, [296] und einen F-W12 spezifischen GroES Promotor [165, 214]. Besonders im F-W12 scheint dadurch die Expression von GFP im Vergleich zu *Fth* LVS verstärkt zu sein (Abb. 13, [214]). In dieser Arbeit wurde der pFIV2-Val Vektor genutzt, einerseits um die Deletionsmutanten des F-W12 zu komplementieren und andererseits um *Fth* LVS und *Fno* U112 mit Genen aus F-W12 zu transformieren (siehe III.1.2.2.2).

1.2.2. Analysen zu OrfE (IglC_{W12})

Um zu untersuchen, ob die in F-W12 gefundenen Genominseln für ein putatives alternatives T6SS kodieren, sollte zunächst die Expression des potentiellen Tubulus-Proteins (IglC, in F-W12 OrfE bzw. *peg.957*) überprüft werden. Mithilfe der Western Blot Analysen konnte die Expression und Sekretion von OrfE (IglC_{W12}) in F-W12 gezeigt werden (Abb. 16). Ebenso wurde OrfE in F-W12 $\Delta impB2C2$ ($\Delta iglC2_{W12}$) und F-W12 $\Delta orfD1$ ($\Delta vgrG_{W12}$) exprimiert und sekretiert. Beides schien im Vergleich zum Wildtyp F-W12 nur minimal vermindert zu sein und somit nur geringfügig von *orfD1* abzuhängen (Abb. 16). Im Gegensatz dazu ist die Sekretion von IglC in *Francisella* von anderen FPI-Genen abhängig (z.B. von *vgrG*, *dotU*, *pdpA*, *iglG* [181-183]. Der Effekt tritt jedoch nur auf, wenn beide Kopien in *Fth* LVS deletiert sind [181]. Da *Fno* U112 nur über eine FPI Kopie verfügt, ist hier eine Deletion, z.B. von *vgrG* (*FTN_1322*), ausreichend, um die IglC-Sekretion zu verhindern [182, 183]. Das verdeutlicht, dass die zweite *Fno* Insel nicht den Deletionseffekt des FPI-Gens *vgrG* kompensieren kann. Darüber hinaus war die Komplementation der F-W12 Deletionsmutanten ($\Delta impB-orfE$, $\Delta impB-orfE \Delta impB2C2$)

mit FIV2-*impB-orfE* erfolgreich, da OrfE im Zelllysate und im ÜS nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der zusätzlichen Promotoren auf dem Vektor war OrfE hier in größeren Mengen detektierbar (Abb. 16). Des Weiteren war ebenfalls die Transformation von *Fth* LVS Δ *iglC* mit FIV2-*impB-orfE* erfolgreich, das OrfE Protein wurde nachweislich exprimiert und sekretiert (Abb. 18). Damit erfolgte hier die OrfE Sekretion IglC(T6SS)-unabhängig und somit lässt sich vermuten, dass *Fth* LVS evtl. über ein weiteres Sekretionssystem verfügt. Im Gegensatz dazu ist die Sekretion von T6SS Effektoren (wie z.B. VgrG, IglG etc.) in *Fth* LVS von IglC abhängig [181].

Zur Generierung des OrfE-Antikörpers wurde ein Peptid verwendet, welches eine Kreuzdetektion des FTN_0044 ermöglichte, da die Aminosäuresequenzen in diesem Proteinbereich nahezu identisch sind (Abb. 17). Demnach zeigte der OrfE-Antikörper bereits in *Fno* U112 und *Fno* U112 Δ *iglC* eine Reaktionsbande gleicher Intensität im Zelllysate (Abb. 18). Damit wurde die *iglC*-unabhängige Expression von FTN_0044 in *Fno* nachgewiesen. Die Transformation mit FIV2-*impB-orfE* führte allerdings zu einer Bande mit etwas größerer Intensität, was auf eine Doppeldetektion von OrfE und FTN_0044 hindeutet (Abb. 18). Im Gegensatz zu *Fth* LVS FIV2-*impB-orfE* konnte in *Fno* U112 FIV2-*impB-orfE* keine (oder nur sehr geringe) Sekretion von OrfE nachgewiesen werden und scheint demnach in *Fno* IglC(T6SS)-abhängig zu sein (Abb. 18). Um zu überprüfen, ob *Fno* und *Fth* Spezies-spezifische Sekretionsunterschiede aufweisen, wie bereits für einige potentiellen T6SS-Effektoren gezeigt wurde [181], mussten jeweils die Wildtypen *Fth* LVS und *Fno* U112 mit *orfE* transformiert und analysiert werden. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit keine (oder nur sehr geringe) Sekretion von FTN_0044 in *Fno* U112 gezeigt werden (Abb. 18). Die Kreuzdetektion des OrfE-Antikörpers macht es möglich den Antikörper auch für weiterführende Untersuchungen bezüglich des Genproduktes von FTN_0044 zu verwenden.

Wie Chong et al. und Wehrly et al. bereits zeigten, wird die Expression von FPI-Genen im Phagosom zum Ende der intraphagosomalen Phase verstärkt [120, 121]. Die Kultivierung von *Francisella* in einem Medium mit 5 % Kaliumchlorid bildet die vorherrschenden Bedingungen im Phagosom artifiziell nach, sodass eine erhöhte Expression und Sekretion der T6SS-Effektoren *in vitro* verfolgt werden kann [169, 183]. Für F-W12, F-W12 Δ *impB2C2*, F-W12 Δ *orfD1* und *Fth* LVS Δ *iglC* FIV2-*impB-orfE* konnte eine leicht verstärkte Sekretion von OrfE durch die Zugabe von KCl festgestellt werden (Abb. 16). In den F-W12 Δ *impB-orfE* FIV2-*impB-orfE* und Δ *impB-orfE* Δ *impB2C2* FIV2-*impB-orfE* Komplementanten schien das KCl sich eher negativ auf die Expression und Sekretion von

OrfE auszuwirken. Das *orfE* Gen befindet sich hier allerdings unter der zusätzlichen Kontrolle der FIV2-Val Promotoren. Zwar sind die Stimuli und Mechanismen der FPI-Genregulationen noch nicht genau verstanden, dennoch konnten u.a. MglA und MigR als FPI-Regulatoren identifiziert werden [176-178]. Wie genau die Sekretion von T6SS-Komponenten durch die Zugabe von KCl induziert wird, ist nicht geklärt. Darüber hinaus wird die *in vitro* KCl-induzierte Sekretion von T6SS-Proteinen kontrovers diskutiert, da einerseits auch ohne KCl potentielle T6SS Effektoren im Kulturüberstand gefunden werden und andererseits die KCl-induzierte Sekretion nicht immer beobachtet werden kann [124, 181, 182].

Die Deletion von verschiedenen Komponenten des T6SS in *Francisella* resultiere in den meisten Fällen zu einem attenuierten oder avirulenten Deletionsstamm [125, 132]. Wie bereits erwähnt, besitzen *Fth* LVS Δ *iglC* und *Fno* U112 Δ *iglC* einen intrazellulären Replikationsdefekt [122, 161, 297]. Angenommen *orfE/peg.957* von F-W12 kodiert für ein IglC-ähnliches Protein mit vergleichbarer Funktion, dann wäre das OrfE Protein evtl. in der Lage den intrazellulären Replikationsdefekt der Δ *iglC* Mutanten zu kompensieren. Die *in vitro* Infektionsversuche mit Makrophagen zeigten, dass OrfE nicht den Defekt kompensieren kann (Abb. 18). Die Transformanten *Fth* LVS Δ *iglC* FPI2-*impB-orfE* und *Fno* U112 Δ *iglC* FPI2-*impB-orfE* vermehrten sich nicht in den Makrophagen (Abb. 18). Sie zeigten ein ähnliches Verhalten wie die Δ *iglC* Mutanten ohne FIV2-*impB-orfE*. Das Ergebnis war evtl. nicht überraschend, da das FTN_0044 („IglC2“ in *Fno*) ebenfalls nicht den Replikationsdefekt einer *Fno* Δ *iglC* Mutanten kompensiert, dennoch waren die Versuche für die Untersuchung eines neuen unbekannten Systems wichtig und sinnvoll. Darüber hinaus zeigten die Deletion der putativen *iglA-C* Genen (*impB-orfE*) in F-W12 keinen Effekt auf die F-W12-Makrophagen-Interaktion (Abb. 16).

1.2.3. Analysen zu OrfD1 (VgrG_{W12})

Als weitere putative Komponente des alternativen T6SS in F-W12 wurde die Expression und Sekretion von Peg.950 bzw. OrfD1 (VgrG_{W12}), welches die putative T6SS Spitze darstellt, untersucht. Da der generierte α -OrfD1-Antikörper nicht funktional zu sein schien (siehe III.1.2.3.1), wurde das OrfD1 Protein mit einer c-Myc-tag-Fusion versehen und in den Wildtyp F-W12 und die F-W12 Deletionsmutanten (Δ *impB-orfE*, Δ *orfD1*, Δ *impB2C2* und Δ *impB-orfE* Δ *impB2C2*) mittels pFIV2-Val transformiert. Somit konnte die Expression und Sekretion von OrfD1 in allen F-W12 Transformanten nachgewiesen werden, allerdings war in allen Proben das c-Myc-Signal in den Western Blot Analysen

etwa gleich schwach, trotz der „Überexpression“ durch die zusätzlichen Promotoren des pFIV2-Val Plasmids (Abb. 19), siehe oben). Das schwache Signal steht den zuvor gemachten Ergebnissen mit dem pFIV2-Val entgegen, da die FIV1-Val-induzierten GFP Expression in F-W12 im Vergleich zu *Fth* LVS FIV1-Val und *Fno* U112 FIV1-Val besonders stark zu sein schien (vgl. Abb. 13 C vs. Abb. 19 A, [214]). Ebenso war die *in trans* Expression von OrfE mittels FIV2-*impB-orfE* in den Komplementanten deutlich erhöht im Vergleich zur „natürlichen“ im Wildtyp (Abb. 16). Daher lässt sich vermuten, dass das Protein OrfD1 unter den getesteten Kulturbedingungen entweder nur sehr schwach exprimiert und sekretiert oder enzymatisch abgebaut wird oder evtl. toxisch wirkt. In *Fth* LVS wurde ebenfalls eine deutlich schwächere Sekretion von VgrG im Gegensatz zu IglC festgestellt [181]. Daher wäre es denkbar, dass der hergestellte α -OrfD1-Antikörper das OrfD1 Protein zwar spezifisch detektierte, jedoch die Proteinmenge in den Proben zu gering war, da für die Antikörperaustestung nicht die FIV2-Transformanten getestet wurden. Wie bereits oben erwähnt, kann die Zugabe von KCl die *in vitro* Sekretion von putativen T6SS Effektormolekülen fördern [169, 183], jedoch scheint KCl keinen Einfluss auf die ohnehin schon geringe Sekretion von OrfD1-Myc in F-W12 und den Mutanten zu besitzen (Abb. 19). Es gibt widersprüchliche Beobachtungen bezüglich der Sekretion von VgrG in *Francisella*. Barker et al. beispielsweise berichtete über eine FPI-unabhängige VgrG Sekretion [170], wohingegen Bröms et al., Eshraghi et al. und Clemens et al. zeigten, dass VgrG nur in Anwesenheit von anderen T6SS-Komponenten (z.B. DotU, IglC, und IglA/B) sekretiert wird [169, 181, 182]. Im Gegensatz dazu wird OrfD1 (VgrG_{W12}) vermutlich unabhängig von den anderen Komponenten des alternativen T6SS sekretiert (Abb. 3, $\Delta impB-orfE$ „ $\Delta iglA-iglC$ “).

Um auszutesten, ob eine *in trans* Expression von *orfD1* in *Fth* LVS möglich ist, wurde die *Fth* LVS $\Delta vgrG$ Mutante mit FIV2-*orfD1*-Myc transformiert. Die Transformanten resultierten in zwei distinkte Koloniephänotypen. Es traten graue und weiße Klone in etwa gleicher Anzahl auf, bei denen das *orfD1*-Myc Fusionsgen im FIV2 mittels PCR-Analyse nachgewiesen werden konnte. Die grauen Klone ähnelten im Aussehen eher dem F-W12 und die weißen Klone dem Erscheinungsbild von *Fth* LVS. Auch die Sequenzierung der Insert *orfD1*-Myc Sequenz von je einem grauen und weißen *Fth* LVS $\Delta vgrG$ FIV2-*orfD1*-Myc Klon zeigte, dass keine Sequenzunterschiede zwischen den Klonen bestanden. Allerdings konnte nur im grauen *Fth* LVS $\Delta vgrG$ FIV2-*orfD1*-Myc (Klon 1) die Expression von OrfD1-Myc nachgewiesen werden (Abb. 20). Im Gegensatz dazu wurde OrfD1-Myc im weißen Klon (Klon 2) weder exprimiert noch sekretiert. Für das VgrG von

Francisella konnte keine *in trans* Sekretion in *E. coli* festgestellt werden [170]. Auch in dieser Arbeit konnte OrfD1-Myc (VgrG_{W12}) nicht in *Fth* LVS Δ vgrG FIV2-*orfD1*-Myc Klon 1 sekretiert werden. Im Gegensatz zur OrfE-Expression, welche unabhängig von *iglC* in *Fth* LVS zu sein scheint, schien die OrD1-Myc Sekretion abhängig von *vgrG* zu sein. Um jedoch abschließend die T6SS-abhängige bzw. unabhängige Sekretion der F-W12 Proteine nachweisen zu können, sollte der Wildtyp *Fth* LVS mit *orfE* bzw. *orfD1*-Myc transformiert und analysiert werden. Ebenso könnte die mögliche Sekretion von OrfD1 in *Fno* U112 getestet werden.

Wie bereits oben erwähnt, kann die *Fth* LVS Δ vgrG Mutante das Phagosom während der intrazellulären Phase nicht verlassen und demnach auch nicht im Zytosol replizieren [171]. Um auszutesten, ob das *orfD1* von F-W12 für ein putatives VgrG-ähnliches Protein mit vergleichbarer Funktion kodiert, wurden die *Fth* LVS Δ vgrG FIV2-*orfD1*-Myc Transformanten für ein *in vitro* Infektionsassay verwendet. Jedoch konnte weder der weiße Klon noch der graue Klon den intrazellulären Replikationsdefekt der *Fth* LVS Δ vgrG Mutante kompensieren (Abb. 20). Interessanterweise zeigte der graue Klon, welcher nachweislich das OrfD1-Myc exprimiert, einen leicht negativen Einfluss auf das intrazelluläre Verhalten der *Fth* LVS Δ vgrG Mutante (Abb. 20). Diese Beobachtung war unabhängig von der Myc-Fusion. Im F-W12 beeinflusste die Deletion von *orfD1* nicht die Interaktion mit den Makrophagen (Abb. 19).

Des Weiteren konnte bereits eine Multimerbildung von VgrG in *Francisella* gezeigt werden und es wird vermutet, dass ein VgrG-Trimer die *Francisella* T6SS-Spitze bildet [171]s. Für das OrfD1-Myc konnte ebenfalls eine Multimerbildung in F-W12 und *Fth* LVS Δ vgrG nachgewiesen werden (Abb. 21). Im Gegensatz zum *Francisella* VgrG scheint OrfD1-Myc primär Dimere zu formen. Hierbei sei nur zu beachten, dass evtl. die Myc-Tag-Fusion die Multimerisierung von OrfD1 beeinflusste.

Das Auftreten von zwei verschiedenen Kolonienphänotypen in den *Fth* LVS FIV2-*orfD1* Transformanten lässt die Vermutung zu, dass OrfD1 von F-W12 die Zusammensetzung der Bakterienoberfläche von *Fth* LVS veränderte. Für *Ftt* und *Fth* LVS sind verschiedene spontan auftretende graue Phänotypen beschrieben, die eine modifizierte Lipid A Komposition aufweisen (verlängert oder verkürzt, [298-300]). Hierbei wurde jedoch eine Farbänderung von Blau (Wildtyp) zu Grau (Mutante) beobachtet, somit hängt das Erscheinungsbild der Kolonien u.a. von den verwendeten Nährböden ab. Der in dieser Arbeit verwendete Nährboden resultierte in weißen *Fth* LVS Kolonien und in graue F-W12 Kolonien. Eine weitere Studie zeigte, dass graue *Fth* LVS Mutanten weniger O-Antigen

exprimieren, über weniger Lipid A Galactosamin-Modifizierungen verfügen und die Expression von zwei Glycosyltransferasen (*flmF2*, *flmK*) reduziert ist [301]. Darüber hinaus zeigten graue Klone ein vermindertes Wachstum im Flüssigmedium und auf Nährböden. Diese Beobachtung konnte für das Wachstum der grauen *Fth* LVS FIV2-*orfD1* Klone im Flüssigmedium nicht bestätigt werden, jedoch resultierten auch sie in kleinere Kolonien beim Wachstum auf Nährböden. Ebenso zeigten Hartley et al. und Soni et al., dass graue *Fth* LVS Varianten in Makrophagen attenuiert sind [298, 301]. In dieser Arbeit wurde Ähnliches beobachtet (Abb. 20). Interessant wäre es zu wissen, ob *orfD1* ebenso einen attenuierten Phänotyp in den Makrophagen beim Wildtyp *Fth* LVS auslösen würde. Weiter gilt es zu klären, warum bei gleicher genetischer Ausstattung der *Fth* LVS FIV2-*orfD1* Transformanten generell zwei unterschiedliche Phänotypen auftreten. Wird OrfD1 im weißen Klon abgebaut, inaktiviert oder blockiert? Da das OrfD1 keine bekannten Signaldomänen exprimiert und auch keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufweist, ist der Grund für den veränderten Koloniephänotyp bisher nur schwer erklärbar.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der F-W12 Stamm über mindestens ein Sekretionssystem verfügt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Genprodukte von *peg.957* (OrfE, IglC_{W12}) und *peg.950* (OrfD1, VgrG_{W12}) Bestandteil eines alternativen T6SS in F-W12 sein könnten. Dafür spricht, dass die Genominseln in F-W12 über alle putativen Komponenten eines Sekretionssystem verfügen, die Proteine OrfE und OrfD1 exprimiert und sekretiert werden, und dass OrfD1 ebenfalls Multimere bildet, wie es bereit für andere T6SS beschrieben ist [171]. Allerdings werden OrfE und OrfD1 in F-W12 scheinbar unabhängig voneinander sekretiert und unterscheiden sich damit zu IglC und VgrG in *Fth* LVS [169, 181-183]. Mindestens zwei Hypothesen wären denkbar: 1. OrfE und OrfD1 sind keine Sekretionssystemkomponenten oder 2. sie sind Bestandteil eines Sekretionssystem, jedoch gibt es mindestens ein weiteres, worüber sie sekretiert werden können.

Darüber hinaus ist das T6SS ein Hauptvirulenzfaktor in *Francisella* und für das Entkommen aus dem Phagosom und für die intrazelluläre Replikation erforderlich [125, 132, 160], dennoch sind die Funktionsweisen von T6SS sehr divers. Von vielen pathogenen Bakterien wird es gegen Wirtszellen zur Abwehrfunktion eingesetzt, indessen verfügen auch avirulente und symbiontisch lebende Bakterien über T6SS [187-189]. *P. aeruginosa* beispielsweise nutzt ein T6SS um konkurrierende Bakterien (*P. putida*) in einer Kokultur abzuwehren und sich behaupten zu können [201]. Dabei werden Effektormoleküle in das Medium abgegeben, welche bakterizid gegen die konkurrierende

Bakterienspezies wirkt, aber von der eigenen Bakterienart neutralisiert werden. Neben den diversen Einsatzmöglichkeiten von T6SS sind ebenfalls die T6SS-kodierenden Gencluster und die T6SS-Strukturen sehr variabel [187, 188]. Das T6SS von *Francisella* stellt im Vergleich zu den kanonischen T6SS einen phylogenetischen Außenseiter dar. Demnach wäre es, trotz der bestehenden Sequenzunterschiede zwischen dem putativen T6SS von F-W12 und dem *Francisella* T6SS, nicht ausgeschlossen, dass die gefundene Genominsel in F-W12 für ein alternatives T6SS kodiert könnte. Um das alternative System in F-W12 weiter zu verstehen, erschließt es sich, nach einer T6SS-Struktur mithilfe von verschiedensten mikroskopischen Verfahren zu suchen, wie z.B. mittels Immunogold-Färbungen und die Kryoelektronentomographie. Mithilfe der Immunogold-Färbung konnte bereits die Struktur der IglA-IglB-Hülle in *Fno* visualisiert werden [169] und die Kryoelektronentomographie wurde für die dreidimensionale Darstellung des T6SS in *V. cholerae* verwendet [204]. Ebenso wäre eine GFP-Markierung einer potentiellen Strukturkomponente und anschließender Mikroskopie denkbar, um zu überprüfen, ob das alternative T6SS in F-W12 ebenfalls größtenteils an den Polen assembliert, wie es bereits in *Fno* gezeigt wurde [124]. Neben den mikroskopischen Verfahren könnte beispielsweise die Interaktion von ImpB (IglA_{W12}) und ImpC (IglB_{W12}) untersucht werden, da die Interaktion der Hüllproteine IglA und IglB essentiell für die Funktionsweise des T6SS in *Francisella* ist [169, 197]. Um allgemein evtl. Effektoren des alternativen T6SS in F-W12 feststellen zu können, wären Analysen des Proteoms hilfreich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der F-W12 über ein Sekretionssystem verfügt und dieses nutzt, um Proteine zu sekretieren. Das System gilt es weiter zu untersuchen, besonders im Hinblick auf Parallelen zur zweiten *Fno* Genominsel.

1.3. Verbleibt F-W12 im Phagosom?

Bisher wurde noch keine Wirtszelle für eine intrazelluläre Replikation für den F-W12 Stamm gefunden, dennoch persistiert der Stamm in Makrophagen, ATII Zellen und Amöben (Abb. 8, Abb. 9). Um zu überprüfen, ob er sich während der intrazellulären Phase in einem Phagosom befindet oder frei im Zytosol vorliegt, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von F-W12-infizierte murine Makrophagen analysiert. Anhand der Bilder konnte festgestellt werden, dass der F-W12 Stamm das Phagosom vermutlich nicht verlässt. Nach 24 h der Inkubation konnte bei der Mehrheit der untersuchten F-W12-haltigen Phagosomen eine vollständige bzw. nur leicht zersetzte Membran festgestellt werden (Abb. 22). Das entsprach nahezu den Resultaten, die bei der

intrazellulären Replikationsmutante *Fth* LVS \DeltaiglC beobachtet wurden. Im Gegensatz dazu befand sich die Mehrheit der *Fth* LVS Bakterien frei im Zytosol der Wirtszelle nach 24 h der Infektion oder waren von einer stark beschädigten Membran umgeben (Abb. 22). Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen können durch die bereits für *Fth* LVS und *Fth* LVS \DeltaiglC publizierten Ergebnissen bestätigt werden [171, 249, 251]. Demnach beginnen die *Fth* LVS Bakterien abhängig von der Opsonierung zwischen 15 min bis zu 4 h nach der Infektion das Phagosom zu verlassen, wohingegen *Fth* LVS \DeltaiglC im Phagosom verbleibt [107, 116, 120, 122, 123]. Somit verhält sich der F-W12 Stamm wie eine natürliche T6SS-Mutante, da deutliche Parallelen zu *Fth* LVS \DeltaiglC bestehen. Das verdeutlicht die Schwierigkeiten eine potentielle Wirtszelle für eine intrazelluläre Vermehrung für den F-W12 Stamm zu finden. Des Weiteren konnte kein Unterschied zwischen dem F-W12 Stamm und der F-W12 $\Delta impB-orfE$ („ $\Delta iglA-iglC$ “) Deletionsmutante ausgemacht werden. Auch sie befand sich vorrangig im Phagosom mit vollständig intakter Membran (Daten nicht gezeigt).

Die beobachtete Persistenz von F-W12 während der Infektionen könnte einerseits auf das Überleben aller intrazellulären F-W12 beruhen oder andererseits auch damit erklärt werden, dass nur ein geringer Prozentsatz der intrazellulären Bakterien sich den intraphagozytären Abtötungsmechanismen widersetzen kann, sich vermehrt, die Wirtszellen verlässt und weitere Zellen infiziert, in denen wiederum nur eine minimale Anzahl an F-W12 überlebt. Beide Varianten würden dazu führen, dass die Bakterienzahl über den gesamten Versuchsablauf relativ konstant bleibt. Mithilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde festgestellt, dass F-W12 sich vermutlich nicht in den Makrophagen intrazellulär vermehrt, da nur selten mehr als ein Bakterium pro Zelle detektiert wurde. Selbst nach einer Infektionsdauer von 96 h waren nur sehr wenige mit F-W12 infizierte Makrophagen zu finden. Außerdem wurden einige „leere“ Vakuolen in den Makrophagen dokumentiert, die evtl. auf die intraphagozytäre Abtötung und Verdauung von F-W12 durch die murinen Makrophagen hinweisen könnten.

1.4. Suche nach Fitness- und Virulenzfaktoren

Für die Identifikation von Virulenzfaktoren in *Francisella* wurden bisher definierte Transposon-Mutantenbanken verwendet, bei denen die Tn-Mutanten einzeln in Infektionen mit Wirtszellen getestet wurden [208, 211-213, 302]. Dadurch war der Aufwand enorm und teilweise die Effizienz nicht zufriedenstellend. Qin et al. beispielsweise untersuchte eine *Ftt* Schu S4 Tn-Mutantenbank mit über 10.000 Klonen und nur bei 18 Mutanten

konnte ein intrazellulärer Replikationsdefekt in hepatischen Zellen festgestellt werden [302]. Im Gegensatz dazu konnte Asare et al. bei der Überprüfung von 3000 Tn-Mutanten in der *Drosophila*-Zelllinie S2 insgesamt 394 Virulenz-relevante Gene identifizieren [213]. Hierbei kodierten etwa ein Drittel der ermittelten Gene entweder für hypothetische Proteine oder für Proteine unbekannter Funktion, jedoch wurden auch bereits bekannte *Francisella* Virulenzgene, wie z.B. FPI-Gene oder Typ-IV-Pilus-Gene, identifiziert [213]. Da das bisher verwendete Testverfahren sehr aufwendig ist, wurde in dieser Arbeit nach einer Methode gesucht, bei dem in relativ kurzer Zeit mit einem geringeren Aufwand möglichst viele Klone einer Mutantenbank parallel getestet werden können. Außerdem sollten Protozoen als Infektionspartner für *Francisella* und deren Nutzung zur Identifikation von Virulenzgenen etabliert werden. Für *L. oakridgensis* und *L. pneumophila* sind bereits Testverfahren beschrieben, bei der eine Tn5-Mutantenbank mithilfe von einer Kokultur mit Amöben (*A. lenticulata* oder *A. castellanii*) zur Identifikation von Virulenzfaktoren untersucht werden kann [232, 233, 303]. Die Tests beruhen auf das Auftreten des sogenannten Scatterphänotyps von amöbensensitiven Klonen. Diese Scattermutanten weisen Defekte in Kolonisationsgenen auf, können von den mobilen Amöben verdaut werden und im Zuge dessen ändert sich die Morphologie der Bakterienkolonie. Auch hierbei konnten bereits beschriebene *Legionella* spezifische Virulenzfaktoren, wie z.B. das Dot/Icm T4SS, bestätigt werden. Die Mehrzahl der identifizierten Gene war vielmehr noch nicht mit der *Legionella*-Virulenz zuvor assoziiert worden [232, 233, 303].

Für die weiterführende Charakterisierung des neuen F-W12 Stammes ist die Einschätzung über dessen Pathogenitätsvermögen essentiell. Zwar konnten *in silico* bereits verschiedene Virulenzfaktoren bestimmt werden, dennoch ist eine experimentelle Bestätigung und das Identifizieren weiterer Faktoren, die an der Interaktion mit möglichen Wirtszellen beteiligt sind, von großer Bedeutung. Aus dem Grund wurde in dieser Arbeit ein Scatterscreen zur Identifikation von Virulenz- und allgemeinen Fitnessfaktoren von F-W12 basierend auf den *Legionella*-Test etabliert. Dabei wurde die Amöbe *A. lenticulata* als „Wirt“ für das Verfahren ausgewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass der F-W12 Stamm über zehn Tage in der Amöbe persistiert und auch keinen Scatterphänotyp bei der Kultivierung auf Nährböden ausbildete (Abb. 9, Abb. 23). Generell unterscheidet sich die *Francisella* Infektion in Makrophagen und Amöben. In Makrophagen repliziert *Francisella* massiv im Zytosol, wohingegen in *A. castellanii* nur eine geringe Vermehrung in einer Vakuole beobachtet wurde [242, 243]. Gleichwohl die T6SS-Deletionsmutante *Fno ΔiglC* auch in

H. vermiformis attenuiert ist und somit für die intravakuoläre Replikation wichtig zu sein scheint [245], jedoch ist die tatsächliche Infektion und Replikation von *Francisella* in Amöben nicht sicher belegt. Buse et al. konnte keine Infektion mit *Ftt*, *Fth* und *Fno* von freilebenden Amöben nachweisen (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *H. vermiformis*) [244]. Diese Beobachtung konnte von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, dennoch begünstigt die Anwesenheit von Amöben die extrazelluläre Vermehrung der Bakterien. Nichtsdestotrotz ist es sehr naheliegend, dass Amöben eine potentielle Rolle im *Francisella* Lebenszyklus einnehmen. *Francisella* nutzt Amöben möglicherweise als Vektoren evtl. zur langfristigen Überdauerung. Ein Hinweis dafür liefert die Beobachtung, dass *Ft* auch Amöbenzysten infizieren kann [242, 243].

Für den Scatterscreen wurde eine F-W12 Mutantenbank mit etwa 10.000 Tn5-Mutanten generiert, von denen etwa 7.000 im Scatterscreen untersucht wurden. Dabei konnten 79 amöbensensitive Klone identifiziert werden, die durch die Transposoninsertion ein wichtiges Genprodukt für die Amöben-Interaktion „verloren“ zu haben schienen. Um zu überprüfen, ob die Scatterklone tatsächlich attenuiert hinsichtlich ihrer Amöbenwiderstandsfähigkeit waren, wurden die 79 Scatterklone mindestens zweimal in einem Persistenzassay mit *A. lenticulata* getestet (Tab. 23, Anhang Tab. 28). Bei mehr als der Hälfte der Scatterklone (43 Klone) wurde eine verminderte Persistenz festgestellt und bestätigte somit die Beobachtungen des Scatterscreens. Insgesamt zeigten weitere 31 Klone eine vergleichbare Persistenz zum Wildtyp und fünf Klone eine leicht erhöhte. Beim Scatterscreen in *Legionella* wurde ähnliches beobachtet. Auch dort waren nicht alle zuvor isolierten Scatterklone in Amöben attenuiert [232, 233, 303]. Ein möglicher Grund für die verschiedenen intrazellulären Phänotypen der amöbensensitiven F-W12 Scatterklone könnten die zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätze sein. Beim Scatterscreen wurden ganze Bakterienkolonien auf festen Nährböden von den Amöben langsam verdaut, wohingegen beim Persistenzassay die Klone einzeln in Suspension gegen die Amöben bestehen mussten. Auch die Dauer der Versuche könnte einen Einfluss haben. Beim Scatterscreen wurden die Amöben und Bakterien für etwa drei Wochen kultiviert und viele Scatterklone bildeten erst zu einem späten Zeitpunkt des Versuchs den Scatterphänotyp aus. Anscheinend wuchs der Überlebensdruck der Amöben und zeitgleich verringerte sich die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bakterien, sodass diese leichter von den Amöben verdaut wurden. Um jedoch „falsch positive“ Scatterklone auszuschließen, wurde der Wildtyp parallel zur Tn5 Mutantenbank dem Scatterverfahren unterzogen und dieser bildete zum Zeitpunkt der Scatterklonisierung keinen Scatterphänotyp aus.

Von insgesamt 34 ausgewählten Scatterklonen wurde der Insertionsort des Transposons bestimmt und dadurch 29 putativ relevante Gene für die Amöben-Interaktion identifiziert (Tab. 23, Abb. 26). Die Genfunktionen der einzelnen Tn5-Insertionsorte wurden in dieser Arbeit weder experimentell bestätigt noch komplementiert (Ausnahme Sc#50, Δ Myo), daher sollten sie nur als putative Gene bzw. Proteine angesehen werden. Mithilfe des Scatterscreens war es möglich, bereits für *Francisella* beschriebene Virulenzfaktoren (*relA*, *galU*, *glpD*, Chitinase) und Virulenzgene anderer Bakterienspezies (*ftsH*, *miaA*, *miaD*) in F-W12 zu identifizieren. Das bestätigt die Funktionalität des Verfahrens. Ebenso konnten *in silico* gefundene Virulenzgene experimentell nachgewiesen werden, wie z.B. die Chitinase, *peg.816* [165]. Des Weiteren wurden Scatterklone mit dem gleichen Tn5-Insertionsort bzw. -gen gefunden. Das war zum Teil unabhängig von der Amöbenlinie und der Temperatur (Tab. 23). In keinem der 34 Tn5-Insertionsorte der Scatterklone wurden Gene der FPI-ähnlichen Genominseln identifiziert (siehe oben). Im Gegensatz dazu konnten in anderen Testverfahren bereits Gene der *Fno* homologen Genominsel gefunden werden (siehe oben). Das macht deutlich, dass diese Genominsel in F-W12 scheinbar nicht unter den gewählten Bedingungen an der Interaktion mit Amöben beteiligt zu sein scheint. Des Weiteren wurden mithilfe des Scatterscreens elf Gene gefunden, die zuvor in anderen Testverfahren in *Francisella* identifiziert wurden. Dabei handelt es sich interessanterweise besonders um Faktoren, die in *Drosophila*-Zelllinien oder adulten Fruchtfliegen eine Rolle spielen. Demnach sollten bei der weiteren Wirtssuche gezielt Insekten(zellen) getestet werden.

1.4.1. Gene des Stoffwechsels

Bei insgesamt 15 Scatterklonen inserierte das Transposon in putative Gene des Stoffwechsels und es konnten insgesamt 14 putative Virulenz-assoziierte Gene bestimmt werden (Tab. 23). Für *Francisella* konnte gezeigt werden, dass Stoffwechselwege, insbesondere die Glykolyse und Gluconeogenese, nicht nur das *in vitro* Wachstum sondern auch die intrazelluläre Replikation beeinflussen [239, 253-255], somit stellen einige Stoffwechselenzyme wichtige Virulenzfaktoren dar. Eine Auswahl an identifizierten Virulenz-assoziierten Stoffwechselgenen des F-W12 wird hier näher beschrieben.

Der sekundäre Botenstoff Guanosintetraphosphat (ppGpp) ist ein globaler Stressregulator und ist an der stringenten Kontrolle beteiligt. Die GTP-Pyrophosphokinase RelA reguliert die intrazelluläre ppGpp-Menge durch die Synthese von pppGpp und dessen Hydrolyse zu ppGpp, damit wurde *relA* in vielen Bakterien als wichtiger Virulenzfaktor identifiziert, wie

z.B. in *M. tuberculosis*, *V. cholerae*, *L. pneumophila* und auch in *Francisella* [304-307]. Eine *Fno* $\Delta relA$ Mutante ist in Makrophagen und Mäusen attenuiert und beim *in vitro* Wachstum erreicht sie verzögert die stationäre Wachstumsphase [308]. Der Sc#49 (*relA*::Tn5) zeigte zwar eine stark verminderte Persistenz in *A. lenticulata* jedoch ein dem Wildtyp ähnliches *in vitro* Wachstum (Tab. 23, Abb. 27). Darüber hinaus wurde das *Fno* Homolog von *peg.1272* (*FTN_1518*) in drei Virulenzsuchverfahren in *Fno* als wichtig für die intrazelluläre Replikation identifiziert [179, 212, 213].

Die Metalloprotease FtsH ist ein membrangebundenes, zytoplasmatisches Protein und prinzipiell am Abbau von zytoplasmatischen und Membranproteinen beteiligt. Darüber hinaus ist FtsH in diversen zellulären Prozessen beteiligt, u.a. spielt es eine Rolle in der Hitzeschockreaktion von *E. coli* und ist an der Aufrechterhaltung der Membran sowie bei der Synthese von Lipid- und Proteinkomponenten des LPS involviert [309-311]. Da die genaue Aufgabe von *ftsH* in F-W12 nicht bekannt ist, wird der Sc#7 (*ftsH*::Tn5) hier als Klon mit inaktiviertem Stoffwechselgen diskutiert. In *Francisella* ist *ftsH* bisher nicht mit der Virulenz in Erscheinung getreten, aber in *Staphylococcus aureus* ist es ein beschriebener Virulenzfaktor [312]. *S. aureus* $\Delta ftsH$ Mutanten besitzen ein reduziertes *in vitro* Wachstum, eine größerer Sensitivität gegen diverse Stressfaktoren und sind in Mäusen attenuiert [312, 313]. Der Klon Sc#7 zeigte ebenso ein reduziertes *in vitro* Wachstum und eine stark verminderte Persistenz in den Amöben, wie bei der *S. aureus* $\Delta ftsH$ Mutante beobachtet wurde. Die verstärkte Sensitivität gegenüber SDS konnte beim Sc#7 nicht festgestellt werden (Tab. 23, Abb. 27).

Der Sc#51 zeigte eine reduzierte Persistenz in Amöben und verfügt über eine Tn5-Integration in die Chitinase *peg.816*, welche bereits in Rydzewski et al. als putatives Virulenzgen von F-W12 benannt wurde (Tab. 23, Abb. 27, [165]). Ebenso konnte eine Chitinase-Aktivität im Kulturüberstand von F-W12 nachgewiesen werden. In verschiedenen Screens wurden bereits verschiedene Chinasen in *Fno* und *Fth* als relevant für die Virulenz in *Drosophila* und Mäusen identifiziert [179, 213]. Darüber hinaus kann *Fno* auf Chitin-haltigen Oberflächen Biofilme bilden und es als Kohlenstoffquelle nutzen [314]. Wie jedoch Chinasen die *Francisella* Virulenz beeinflussen ist noch völlig unbekannt.

Als weitere mit der Virulenz-assoziierten Gene des Stoffwechsels wurden eine Hydratase (Sc#4), Hydrolase (Sc#6), Prolindehydrogenase (Sc#33), Transaldolase (Sc#39), Cytochromoxidase (Sc#55), Glyceroldehydrogenase (Sc#62) und ein Hem-bindendes Enzym (Sc#66) bereits in anderen Virulenzstudien in *Fno* bestimmt (Tab. 23 und Anhang

Tab. 28, [179, 208, 211-213]. Den Einfluss dieser Gene auf die Wirt-Pathogen-Interaktion wurde jedoch noch nicht näher charakterisiert. Interessanterweise erwiesen sich nicht alle dieser Scatterklone als attenuiert in den *A. lenticulata* (Tab. 23, Abb. 27). Die Scatterklone Sc#22 und Sc#24 entwickelten zwar den Scatterphänotyp, dennoch zeigten sie keine verminderte Persistenz in den Amöben, wobei die Überlebensrate der Bakterien zwischen den Versuchen stark schwankte (Tab. 23Abb. 27). Das Transposon inserierte bei den Klonen in *peg.1091*, welches für eine putative Phosphat-Pyruvat-Kinase PpdK kodiert und eine wichtige Rolle in der Gluconeogenese einnimmt. PpdK konnte bereits als Virulenzfördernd in *Brucella* identifiziert werden [315]. Die Hydroxylase (Sc#56) und die Glucokinase (Sc#50) wurden zuvor noch mit der „Wirt-Pathogen-Interaktion“ in Verbindung gebracht. Die beiden Klone entwickelten zwar den Scatterphänotyp, dennoch besaßen sie keine reduzierte Persistenz in den Amöben (Tab. 23, Abb. 27). Der Sc#50 wird unter diskutiert.

1.4.2. Gene der Zellhülle

Mithilfe des Scatterscreens wurden 13 Klone identifiziert, bei denen das Transposon in insgesamt sieben verschiedenen Genen inserierte, die am Aufbau und dem Erhalt der Zellhülle beteiligt sind (Tab. 23). Prinzipiell enthält die *Francisella* Zellhülle eine Vielzahl an Virulenzfaktoren [100]. Neben der Kapsel und der atypischen Lipid A Komposition des LPS besitzen auch Proteine der innen und außen Membran einen Einfluss auf die *Francisella* Virulenz. Sie dienen einerseits dazu vom Immunsystem des Wirten nicht erkannt zu werden und andererseits fördern sie die Invasion in den Zielzellen [100]. Generell stellt die Bakterienoberfläche die Schnittstelle zum Wirt dar und entscheidet somit maßgeblich über das Schicksal der Bakterien. Die Mehrheit der Scatterklone, die eine Tn5-Insertion in einem putativen Gen der Zellhülle besaßen, waren besonders stark in *A. lenticulata* attenuiert (Tab. 23). Einige Virulenz-assoziierten Gene der Zellhülle von F-W12 werden hier diskutiert.

Im Scattertest wurden sechs Klone gefunden, bei denen das Transposon in zwei putative Gene eines Phospholipid-Transportsystem integrierte. Bei fünf Klonen (Sc#17, #20, #28, #32, #65) inserierte das Tn5 im putativen *m1aA* und bei einem (Sc#21) in *m1aD*. Der ABC-Transporter ist für die Aufrechterhaltung der Lipid-Asymmetrie der äußeren Membran beteiligt, indem es Phospholipide von der äußeren zurück zur inneren Membran transportiert [316, 317]. M1aA bzw. VacJ ist ein charakterisierter Virulenzfaktor in *Shigella flexneri*. Wie bereits für eine *S. flexneri* $\Delta m1aA$ Mutante beschrieben, wiesen auch

die F-W12 *mlaA*::Tn5 Mutanten eine erhöhte SDS-Sensitivität auf und waren *in vitro* attenuiert (Tab. 23, Abb. 28, [318, 319]). In *M. tuberculosis* ist *mld* bei der Invasion und der intrazellulären Replikation involviert [320-322]. Der Sc#21 (*mld*::Tn5) zeigte ebenso eine stark verminderte Persistenz in Amöben und zusätzlich wie die *mld*::Tn5 Klone eine erhöhte SDS-Sensitivität (Tab. 23, Abb. 28). In *Francisella* wurden die *Fno* Homologe von *mld* und *mld* bereits in Virulenzüberprüfungstest in *Drosophila* und in Mäusen identifiziert [211, 213].

In zwei Scatterklonen (Sc#14, #16) inserierte das Transposon in eine putative Uridyltransferase *galU*, die an der Biosynthese der Polysaccharide der Kapsel und des LPS und weiterer Außenmembranproteinen involviert ist. Die beiden Scatterklone zeigten eine reduzierte Persistenz in *A. lenticulata* und jedoch keine verringerte SDS-Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 23, Abb. 28). In *S. pneumoniae* und *Klebsiella pneumoniae* ist *galU* ein bekannter Virulenzfaktor [323, 324] und auch einen *Fth* LVS $\Delta galU$ Mutante ist im Mausmodell stark attenuiert [325].

Darüber hinaus wurden weitere Gene im Test gefunden, die an der Synthese der Zellhülle beteiligt sind, dazu gehören die Glycosyltransferase *gtrB* (Sc#19), LPS-Assemblierungsprotein *lptE* (Sc#37, #46), Dideoxygalactose Transaminase *degT* (Sc#2) und Serinprotease *htrB* (Sc#30). Sie alle zeigten eine verminderte Persistenz in den Amöben und die Serinprotease HtrB wurde bereits in anderen Virulenztest gefunden ([213], Tab. 23, Abb. 28).

1.4.3. Weitere identifizierte Gene

Mithilfe des Scatterscreens wurden weitere Gene identifiziert, die in der Interaktion mit Amöben beteiligt zu sein schienen, jedoch waren die beobachteten Ausprägungen im Persistenzassay nicht gravierend. Nichtsdestotrotz wurden auch hier Gene bestimmt, die bereits bei anderen Screening-Verfahren auffällig waren. Dazu zählen das Transportprotein YrbC (Sc#27), das GTP-bindende Protein TypA (Sc#40) und eine Endoribonuclease HigB (Sc#36) ([212, 213], Tab. 23 und Anhang Tab. 28). Darüber hinaus wurde ein *Allofrancisella*-spezifisches Gen (*peg.766*, Sc#54) identifiziert. In *Francisella* existiert dazu kein homologes Protein.

1.5. Stoffwechsel von F-W12

1.5.1. Glucokinase-Mutante (Sc#50)

Der Scatterklon #50 wurde im Scatterscreen mit der Amöbe *A. lenticulata* 118 isoliert, dennoch war der Klon im Persistenzassay nicht attenuiert, indes zeigte er ein reduziertes *in vitro* Wachstum (Tab. 23, Abb. 27). Die Analyse des Tn5-Insertionsortes ergab, dass das Transposon in eine putative Glucokinase (*peg.721*) im Genom von F-W12 integriert vorlag. Die Sequenzabgleiche mit Glucokinasen von *Fth*, *Fno*, *Ftt* und *Allofrancisella* machten deutlich, dass Peg.721 relativ große Sequenz- und Proteinidentitäten mit diesen Glucokinasen aufweist (Tab. 24). *Fth* und *Ftt* verfügen über ein zweites *glk* Gen, welches jedoch nur noch als Pseudogen im Genom vorhanden ist [326]. FTN_0462 ist die einzige Glucokinase in *Fno*. Bisher konnte *glk* nicht mit der Virulenz von *Francisella* oder anderen Bakterien in Verbindung gebracht werden, daher ist das Auftreten des Scatterphänotyps bisher nicht erklärbar, ebenso wenige die scheinbar leicht erhöhte *in vivo* Persistenz (Tab. 23, Abb. 27). Allgemein ist die Glucokinase für den ersten Phosphorylierungsschritt in der Glykolyse verantwortlich. Sie stellt die stoffwechselaktive Form der Glucose, Glucose-6-phosphat, her. Das Glucose-6-phosphat wird durch eine Glucose-6-phosphat-Isomerase zu Fructose-6-phosphat isomerisiert (kodiert durch *pgi*) und über Glycerinaldehyd-3-phosphat in Pyruvat gespalten, welches weiter für Abbau-, Umwandlungs- und Syntheseprozesse genutzt wird.

Wachstumsanalysen und *in vitro* Markierungsversuche mit [U-¹³C₆]-Glucose machten deutlich, dass der Sc#50 die Glucose nicht verwerten kann und das inaktivierte *peg.721* dafür verantwortlich ist. Die *in trans* Komplementation des Sc#50 mit FIV2-*glk* führte zur Aufhebung des reduzierten *in vitro* Wachstums (Abb. 29). Im Gegensatz zu *E. coli* ist der F-W12 für ein vollwertiges Wachstum auf die Glucokinase angewiesen. *E. coli* kodiert zwar ein *glk* Gen benötigt dieses aber nicht zwangsläufig für die Nutzung von Glucose, da die Glucose bereits beim Transport in die Zelle durch das Phosphotransferasesystem (PTS) in Glucose-6-phosphat umgewandelt wird [327]. Das scheint im F-W12 nicht der Fall zu sein und demzufolge verfügt F-W12 nicht über ein PTS, wie es auch für andere *Francisella* Stämme *in silico* gezeigt wurde [255, 328]. Darüber hinaus wurden *Francisella* Spezies-spezifische metabolische Unterschiede festgestellt [329]. Zwar nutzen alle Stämme Glucose, aber nur *F. hispaniensis* und *F. philomiragia* und möglicherweise einige *Fth* Stämme können Glucose-1-phosphat oder Glucose-6-phosphat nutzen [17, 329]. Mithilfe der [U-¹³C₆]-Markierungsversuche wurde deutlich, dass die Glucose in F-W12 abgebaut wird, und dass der Kohlenstoff für den Aufbau von Aminosäuren und anderen

Kohlenhydraten genutzt wird, da hier die Markierungen im Sc#50 fehlen (Abb. 29). Interessanterweise war in der *glk::Tn5* Mutante die Menge an markierter Fructose nicht reduziert. Während der Glykolyse wird Glucose-6-phosphat durch eine Glucose-6-phosphat-Isomerase in Fructose-6-phosphat umgewandelt. Da jedoch die Menge an markiertem Glucose-6-phosphat in der *glk::Tn5* Mutante reduziert war, kann die Markierung der Fructose nicht diesen Weg genommen haben. In *E. coli* gibt es eine weitere Glucose-Isomerase, die Xylose-Isomerase XylA [330]. Diese kann Xylose zu Xylulose und Glucose zu Fructose isomerisieren. *In silico* konnte kein XylA-Homolog in F-W12 identifiziert werden. Nichtsdestotrotz scheint der F-W12 Stamm Glucose auf einen bisher unbekannten Weg in Fructose umzuwandeln. Die hier gezeigten Versuche verdeutlichen, dass das *peg.271* für eine Glucokinase kodiert, sie am Umsatz der Glucose beteiligt ist und F-W12 kein weiteres Gen mit Glucokinase-Aktivität besitzt.

1.5.2. Myo-Inositol Stoffwechsel

Myo-Inositol (MI) ist Bestandteil der Membran (Phospholipide) und ein sekundärer Botenstoff in eukaryotischen Zellen [331]. Im Menschen wird es aus Glucose-6-phosphat gebildet. Die phosphorylierte Form des MI, das Phytat, ist ein wichtiger Speicherstoff von Phosphor und Kohlenstoff und kommt u.a. im Boden und vor allem in großen Mengen in Samen und Früchten vor [256-258]. Einige Bakterien sind in der Lage MI als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Bisher sind zwei Abbauwege von MI beschrieben. Beim Prominentesten wird das *iol* Operon genutzt und dabei wandelt eine MI-Dehydrogenase (IolG) das MI in Dihydroxyacetonphosphat und Acetyl-CoA um [332]. Der Alternativweg nutzt eine MI-Oxygenase zur Umwandlung des MI in Glucuronat, welches weiter bis Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat abgebaut wird. Bei Genomanalysen wurde in einigen *Fno* Stämmen und *F. philomiragia* (ATCC 25015) ein Glucuronat-Metabolismus-Locus mit neun ORFs in einem putativen Operon gefunden, dabei wurde die Funktionalität des putativen Stoffwechselweges noch nicht experimentell bestätigt [262]. Die Stämme *Ftt* und *Fno* U112 haben das Operon im Gegensatz dazu vermutlich zugunsten der Wirtsanpassung verloren [262]. *In silico* wurde im Umweltisolat F-W12 ein putativer Glucuronat-Metabolismus-Locus mit sieben putativ am MI-Stoffwechsel beteiligter Gene inklusiver einer MI-Oxygenase (*peg.284*) gefunden (Abb. 30) [216]. *Peg.284* verfügt über eine Proteinidentität zur MI-Oxygenase von *Arabidopsis lyrata* von 41 % und zu den MI-Oxygenasen anderer *Francisella* 81 - 88 % (Tab. 25). Darüber hinaus wurden in den Umwelt-assoziierten *A. guangzhouensis* und *F. halioticida* Stämmen ebenfalls ein MI-

Gencluster gefunden, jedoch scheint es in F-W12, *A. guangzhouensis* und *F. halioticida* um zwei ORFs im Vergleich zu *Fno* Fx1 und *F. philomiragia* (ATCC 25015) verkürzt (Abb. 30). Hier fehlen ein Melibiose-transporter und eine putative Sucrase (α -Glucosidase). Wie bereits oben erwähnt, stellt Phytat die phosphorylierte Form von MI dar. Mithilfe verschiedener Phytasen kann das Phytat in MI und andere Zucker abgebaut werden. Ein Vertreter ist die Histidinsäure-Phosphatase, welche bei Pilze und *E. coli* vorkommt und über eine konservierte aktive Peptidsequenz, dem RHGXRXP-Motiv, bei sonst fehlender Sequenzidentität verfügt [333]. *In silico* konnte im F-W12 ein ORF (*peg.427*) mit der Peptidsequenz bzw. einem Pfam His_Phos.2 Motiv (Histidinsäure-Phosphatase) gefunden werden, welcher somit für eine putative Phytase kodieren könnte [216]. Ebenso konnte ein weiteres am MI-Stoffwechsel beteiligtes Gen im Genom von F-W12 ausgemacht werden (*peg.487*), welches für eine putative Inositol-1-Monophosphatase kodieren könnte. Zum FN3523 Homolog besitzt *Peg.427* und *Peg.487* eine Proteinidentität von 87 % bzw. 81 %, deren Funktion wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht [216]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der F-W12 Stamm MI zum Wachstum als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen kann, da die MI-Zugabe im Medium ohne Glucose das Wachstum signifikant erhöhte (Abb. 31) [216]. Im Gegensatz dazu war ein reduziertes Wachstum in der Δ Myo Mutante festzustellen. Darüber hinaus wurde die F-W12 Δ Myo Mutante erfolgreich mit dem MI-Gencluster komplementiert, was zur signifikanten Aufhebung des reduzierten Wachstums führte. Ebenso konnte experimentell bestätigt werden, dass *Fno* Fx1 im Gegensatz zu *Fno* U112 über den Glucuronat-Metabolismus-Locus verfügt und MI zum *in vitro* Wachstum genutzt werden kann (Abb. 31). Weiter konnte mithilfe von Markierungsversuchen mit $^2\text{H}_6$ -MI gezeigt werden, dass F-W12 das MI metabolisiert und es einen ^2H -Fluss zu Protein-gebundenen und freien Aminosäuren (z.B. Phenylalanin) sowie anderen Zuckern gibt (Abb. 31). Da in Δ Myo noch minimale Mengen an ^2H -Markierung zu finden sind, könnte MI auch mittels anderer Zuckertransporter in die Zelle aufgenommen werden. Mögliche Kandidaten wären *peg.112* (Pfam MFS_1) oder *peg.717* (putative Zuckerpermease, Pfam MFS_1) [216].

Zusammenfassend könnte der putative MI-Stoffwechsel in F-W12 wie folgt aussehen (Abb. 40): Das Genprodukt von *peg.427* fungiert als Histidinsäure-Phosphatase und wandelt das Phytat in MI um, welches mithilfe des Zuckertransporters *Peg.283* in die Bakterienzelle transportiert wird. Hier könnte das MI mithilfe der MI-oxygenase (*Peg.284*, MIOX) in Glucuronat (D-Glucuronat) über Fructuronat (Glucuronat-isomerase, *UxaC* [*Peg.282*]) und Mannonat (D-Mannonat-oxidoreduktase, *UxuB* [*Peg.278*]) zu KDG (via

Mannonat-dehydratase, UxuA [Peg.279]) und schließlich zu KDGP (mittels KDG-Kinase, KdgK [Peg.280]) umgewandelt werden. Die putative KDGP-Aldolase (Eda, Peg.281) könnte das KDGP weiter zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) abbauen. Darüber hinaus verdeutlichten weitere Untersuchungen den Haupt-²H-Fluss von MI zur Gluconeogenese (Aufbau von Polysacchariden via GAP) und zum Lactat (via Pyruvat) in F-W12 [216].

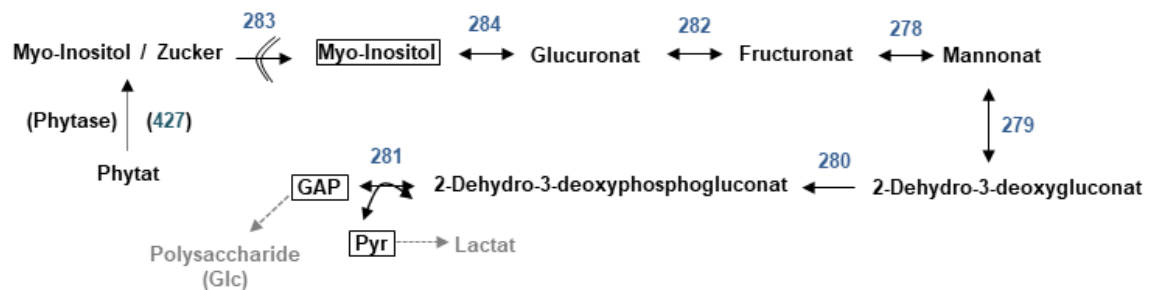


Abb. 40: Putativer Myo-Inositol-Metabolismus in F-W12. Das in der Umwelt zu findende Phytat könnte durch die putative Phytase (Peg.427) in MI oder andere Zucker umgewandelt werden. Durch den Zuckertransporter (Peg.283) könnte MI in die Bakterienzelle transportiert werden, in der es mithilfe weiterer enzymatischer Schritte und der KDGP-Aldolase (Eda, Peg.281) zu Pyruvat (Pyr) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) abgebaut wird. Dabei entstehen folgende Zwischenprodukte: MI via MI-oxygenase (Peg.284) zu Glucuronat via Glucuronat-isomerase (Peg.282) zu Fructuronat via Mannonat-oxidoreduktase (Peg.278) zu Mannonat via Mannonat-dehydratase (Peg.279) zu 2-Dehydro-3-deoxygluconat via KDG-Kinase (Peg.280) zu 2-Dehydro-3-desoxyphosphogluconat. Darüber hinaus konnte der Haupt-²H-Fluss von Pyr zu Lactat bzw. von GAP zu Polysacchariden gezeigt werden. Verändert nach Chen et al. 2020 (in Revision) [216].

2. Humanes ex vivo Lungeninfektionsmodell

Zur Analyse des intrazellulären Infektionsverlaufes von *Francisella* finden verschiedene Zelltypen Anwendung. Da Makrophagen zu den Hauptzielzellen von *Francisella* während einer Infektion zählen, werden bevorzugt humane und murine Makrophagen genutzt, jedoch unterscheiden sich die Infektionsverläufe und die induzierte Chemokin- und Zytokin-Produktion in humanen und murinen Makrophagen, sodass eine Übertragbarkeit der Ergebnisse limitiert ist [334, 335]. In Mausmakrophagen wurde die Aufnahme von *Francisella* in Autophagosomen nach der zytosolischen Replikation beobachtet, wohingegen dieser Mechanismus für humane Zellen noch nicht beschrieben ist [116]. Für komplexe Analysen bezüglich der Pathogenität und der Wirt-Pathogen-Interaktion wurden zu Beginn der *Francisella* Forschung Menschen und Primaten als Versuchsobjekte favorisiert eingesetzt [8, 9, 79]. Aus ethischen Gründen werden diese Modelle heutzutage kaum noch genutzt, stattdessen werden Mäuse, Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen

als Tiermodelle verwendet [336]. Der Infektionsverlauf ist in der Maus und im Menschen vergleichbar, doch gibt es große Unterschiede bezüglich der Suszeptibilität gegenüber den verschiedenen *Francisella* Arten. Im Gegensatz zum Menschen ist die Maus hoch sensitiv für Infektionen mit *Fno* [129, 337, 338]. Die bisherigen Infektionsmodelle für *Francisella* weisen demnach Limitationen auf, einerseits aufgrund der mangelnden Komplexität (Zellkultur) und andererseits aufgrund der ethnischen Unvertretbarkeit für Tiermodelle sowie der begrenzt Übertragbarkeit auf den Menschen (Mausmodell). Aus dem Grund ist es erforderlich neue Infektionsmodelle zu entwickeln. Da besonders die pulmonale Tularämie schwere Verläufe mit einer Mortalitätsrate bei unbehandelten Fällen bis zu 60 % aufweist [67], sollte diese Infektionsform in den Fokus eines neuen Infektionsmodells gestellt werden. Das humane *ex vivo* Lungeninfektionsmodell erfüllt diese Kriterien und ist bereits für einige Pathogene etabliert, die ebenso schwere Pneumonien auslösen oder über die Lunge invadieren. Neben verschiedenen Viren, wie z.B. den Influenza- und Corona-Viren, ist das Modell auch für bakterielle Pathogene, wie *S. pneumoniae*, *Salmonella enterica* und *L. pneumophila*, geeignet [263-265].

Die mir zur Verfügung gestellten Lungengewebsproben wurden während Lungen- oder Lungenlappensektomien bei Bronchialkarzinompatienten entnommen. Das Gewebematerial entspricht den Lungensäckchen mit den Lungenbläschen (Alveolen). Die Alveolen stellen komplexe dreidimensionale Strukturen dar, die über die Bronchien und der Luftröhre mit Luft versorgt werden. Die Alveolen werden von einem dichten Kapillarnetz aus Endothelzellen umgeben. Die Hauptbestandteile des Alveolarepitheliums sind Alveolarepithelzellen des Typ I (ATI) und des Typ II (ATII). Die langgestreckten ATI Zellen umfassen > 95 % der Epitheloberfläche und zusammen mit der Basalmembran bilden sie eine dünne Barriere und ermöglichen den Gasaustausch [339, 340]. Neben den ATI Zellen besteht die Alveolarepitheliumoberfläche zu 4 % aus den kubischen ATII Zellen, trotz der unterschiedlichen Anteile an der Alveolaren Oberfläche sind ATI und ATII Zellen in gleicher Anzahl in der Lunge vorhanden. Die ATII haben diverse Funktionen, u.a. produzieren sie das Surfactant und sind für die Regeneration des alveolaren Epitheliums verantwortlich, indem sie zu ATI-Zellen ausdifferenzieren können [340-342]. Das Lungenepithelium bildet als physiologische Barriere die erste Abwehr gegen respiratorische Infektionen. Ebenso sind im Mucus antimikrobielle Stoffe, wie Defensine, Stickoxide und Reaktive Sauerstoffradikale, enthalten, die von den Bronchialepithelzellen sekretiert werden [343]. Weitere wichtige Lungenzellen in der Keimabwehr sind Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen [344, 345]. Zusammen

mit dem Lungenepithelium modulieren sie die Immunreaktion. Bei einer systemischen Aktivierung werden weitere Immunzellen, wie Granulozyten, Monozyten und T Lymphozyten, rekrutiert [346-348]. Demnach kann mithilfe eines *ex vivo* Lungeninfektionsmodells nur eine lokale Infektion nachgestellt werden. Nichtsdestotrotz kann die lokale und Teile der angeborenen Immunabwehr untersucht werden (durch ATII Zellen, Makrophagen etc.).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das Lungeninfektionsmodell erfolgreich für *Francisella* etabliert. Für *Fth* LVS und das *Fth* Patientenisolat A660 konnte eine Replikation in den Lungengewebestücken festgestellt werden (Abb. 33). Im Gegensatz dazu war keine Zunahme der kultivierbaren Bakterien bei der intrazellulären Replikationsmutante *Fth* LVS \DeltaiglC und dem Umweltisolat F-W12 zu verzeichnen. Demzufolge persistiert der F-W12 Stamm auch im humanen Lungengewebe, wie zuvor *in vitro* bei Amöben, Makrophagen und Epithelzellen beobachtet wurde, und ist in der Lage der intraphagozytären Abtötung zu widerstehen. Bereits diese Eigenschaft kann zur Pathogenität eines Krankheitserregers beitragen (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 33). Darüber hinaus war eine leicht verstärkte Replikation des Patientenisolates *Fth* A660 im Vergleich zu *Fth* LVS zu verzeichnen (Abb. 33), somit deuten die Ergebnisse des Lungeninfektionsmodells den attenuierten Phänotyp des *Fth* LVS an, welcher hingegen nicht *in vitro* in Makrophagen und ATII Zellen zum Vorschein kam (Abb. 33). Generell ist nur in wenigen Zellkulturen ein Replikationsunterschied zwischen *Fth* LVS und anderen *Fth* Stämmen ersichtlich. Wie bereits gezeigt wurde, tragen maßgeblich die Deletionen von *fopC* und *pilA* im *Fth* LVS Genom für dessen Attenuation im Vergleich zu *Fth* „Wildtypstämmen“ bei [349]. Die Komplementation mit dem Außenmembranprotein FopC (FTH_0431) und dem Typ IV Pilus Protein PilA (FTH_0384) in *Fth* LVS führte zur Rückkehr zur vollen *Fth* Virulenz im Mausmodell [350]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass gerade FopC für die Suppression der pro-inflammatorischen Interferon-(IFN)- γ -induzierten Immunantwort verantwortlich ist [351]. Die Hauptproduzenten von IFN- γ sind T-Zellen, natürliche Killer (NK) Zellen und Makrophagen und IFN- γ dient u.a. der Makrophagenaktivierung [114, 115]. Somit könnte nur *Fth* A660 im *ex vivo* Lungenmodell in der Lage sein, die IFN- γ -Sekretion durch Makrophagen, T Zellen oder NK Zellen zu unterbinden, was sich in der geringfügig-erhöhten Replikationsrate ausdrückte. Für *Fth* LVS konnte bereits gezeigt werden, dass IFN- γ maßgeblich zur Kontrolle einer primären *Fth* Infektion in der Maus beiträgt [352, 353]. IFN- γ -aktivierte Makrophagen waren in der Lage das intrazelluläre Wachstum von *Fth* LVS zu inhibieren und konnten *Fth* LVS schneller im Vergleich zu

virulenten *Fth* Stämmen eliminieren [354, 355]. Darüber hinaus konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass gerade IFN- γ über den Verlauf einer Lungeninfektion mit *Fth* LVS entscheidet, jedoch den Verlauf von Infektionen mit virulenten *Fth* Stämmen kaum beeinflusst [356]. Zur Klärung der Hypothese, ob IFN- γ für den Replikationsvorteil des *Fth* Patientenisolates A660 mitverantwortlich ist, könnten die Kulturüberstände des Lungengewebes zur Bestimmung der IFN- γ Konzentration genutzt werden. Ebenso könnten die Kulturüberstände von *in vitro* infizierte primärisolierte Makrophagen genutzt werden. Um den Replikationsunterschied zwischen *Fth* LVS und *Fth* Patientenstämmen zu bestätigen, sollten zunächst weitere Patientenisolate im Lungenmodell getestet werden.

Darüber hinaus war es möglich, die ausgeschwemmten bzw. mobilen Zellen des Lungengewebes („Lungendurchfluss“) für Infektionen zu verwenden. Da die Replikation der *Francisella* Stämme in den Zellen des Lungendurchflusses den Infektionen primärisolierten AM und der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 widerspiegelte, handelte es sich dabei vermutlich größtenteils um Alveolarmakrophagen. Mithilfe der primärisolierten Alveolarmakrophagen konnte die Infektion mit *Fth* A660 nach 48 h visualisiert werden (Abb. 33). Interessanterweise waren hier die Bakterien nicht über den gesamten Alveolarmakrophagen verteilt, sondern sie lokalisierten in mehrere kleine und große „Infektionsherde“. *Francisella* besitzt keine Geißel(n), ist demnach nicht motil und ein „Ausschwärmen“ in der gesamten Zelle nicht möglich. Erst zum späteren Zeitpunkt der intrazellulären Replikationsphase wird die gesamte Wirtszelle mit *Francisella* ausgefüllt sein. Die einzelnen „Herde“ repräsentieren evtl. einzelne lysierte Phagosomen.

Ziel des *ex vivo* Lungenmodells war es auch die infizierten Zelltypen innerhalb der humanen Lunge zu identifizieren, wie es bereits für andere bakterielle und virale Pathogene mithilfe des Lungeninfektionsmodells gezeigt wurde. Das MERS-Coronavirus kann beispielsweise ATI, ATII und Epithelzellen infizieren und löst große strukturelle Schäden des Alveolarepitheliums aus [263], wohingegen *L. pneumophila* zwar an das gesamte Epithelium adhäriert, dabei vorrangig nur AM infiziert. Ebenso konnte hier zum Teil starke Gewebeschädigungen durch die Bakterien gezeigt werden [265]. Für *Francisella* existieren dazu bisher nur Daten aus dem Mausinfektionsmodell. Dabei wurde festgestellt, dass sich der primärinfizierte Zelltyp mit fortschreitender Infektionsdauer ändert. Zum frühen Zeitpunkt der Infektion (24 h) sind Alveolarmakrophagen die primärinfizierten Zellen, jedoch zum späteren sind es Neutrophile [129]. Diese Zunahme der infizierten Neutrophilen geht dabei nicht mit einem Neutrophil-Influx einher. Zusätzlich werden in der murinen Lunge auch dendritischen Zellen und ATII von

Francisella infiziert und als Replikationsort genutzt [128, 129]. Des Weiteren existieren *Francisella* Spezies-spezifische Unterscheide während einer pulmonalen Tularämie, denn nach 24 h der Infektion mit *Fno* sind bereits etwa ein Viertel der infizierten Zellen Neutrophile [129]. Leider konnten die Analysen zu den infizierten Zelltypen im *ex vivo* Lungeninfektionsmodell während meiner Doktorarbeitszeit nicht abgeschlossen werden, dennoch konnten vorläufige Ergebnisse zeigen, dass *Fth* A660 Alveolarmakrophagen in der humanen Lunge infizierte und sich in ihnen vermehrte (siehe Anhang Abb. 41). Ob *Fth* auch die humanen ATII Zellen als Replikationsort während einer Infektion nutzt, wie es in Mauslungen gezeigt wurde, ist unklar [128, 129]. Der bisher verwendete ATII-spezifische Antikörper kreuzreagierte mit *Francisella*. Des Weiteren zeigten die vorläufigen Ergebnisse, dass *Fth* auch in der humanen Lunge Erythrozyten infiziert, wie es bereits in der Zellkultur gezeigt wurde [94]. Somit könnte sich das von Faron et al. entwickelte Modell bestätigen, dass *Francisella* in der humanen Lunge über die Kapillaren in die Blutbahn übergehen kann, obwohl die Beteiligung von ATII Zellen im Lungenmodell noch gezeigt werden muss [357]. Aufgrund der geringen Replikationsfähigkeit von *Francisella* in den Erythrozyten wird davon ausgegangen, dass *Francisella* diese Zellen vorrangig nutzt, um sich im gesamten Wirtsorganismus ausbreiten zu können [94]. Als weitere potentiell infizierte Zellen könnten auch die DZ und Neutrophile analysiert werden.

Das *ex vivo* Lungeninfektionsmodell stellt ein komplexes dreidimensionales Infektionsmodell dar und verfügt über viele Vorteile, die andere etablierte *Ft* Infektionsmodelle nicht erfüllen, trotzdem werden im Folgenden kritische Punkte diskutiert. Das *ex vivo* Lungeninfektionsmodell repräsentiert nicht die tatsächliche Invasion von *Francisella* in die Lunge, z.B. durch das Inhalieren von kontaminierten Aerosolen, dennoch wird die Invasion auf zellulärer Ebene reproduziert. Generell ist die Schwere einer Tularämie abhängig von der Eintrittspforte und der Subspezies des Erregers [1]. Im Gegensatz zum *Ftt* Schu S4 Stamm, der eine minimalinfektionsauslösende Dosis von weniger als zehn Bakterien bei der Inhalation besitzt, werden insgesamt 10^8 *Fth* LVS Bakterien in Aerosolen benötigt, um eine klinisch symptomatische Infektion im Menschen auszulösen [8, 9, 358]. Dadurch lässt sich die relativ hohe Infektionsdosis im *ex vivo* Lungeninfektionsmodell erklären. Es wäre dennoch interessant auszutesten, ob tatsächlich zehn *Ftt* Schu S4 Bakterien auch in diesem Modell für eine Infektion ausreichend sind.

Die Verwendung von primären humanen Lungengewebe stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber anderen Infektionsmodellen dar. Nachteilhaft ist jedoch, dass das Gewebe nur begrenzt verfügbar und relativ „kurzlebig“ ist. Anwendungen über 72 h werden nicht

empfohlen [359]. Aufgrund der individuellen Unterschiede der Spender können ebenso die einzelnen Infektionen untereinander relativ stark schwanken, wodurch es zu größeren Standardabweichungen kommen kann. Diese Schwankungen spiegeln dahingegen die individuelle Suszeptibilität der einzelnen Patienten für *Fth* wider und liefern daher ein reales Bild.

Wie in dieser Arbeit verdeutlicht werden konnte, ist das humane *ex vivo* Lungeninfektionsmodell für *Francisella* geeignet und liefert zuverlässige Resultate, nichtsdestotrotz sollten die infizierten Zelltypen identifiziert und das Zytokin- und Chemokinprofil der infizierten Lunge analysiert werden, um die pulmonale Infektion mit *Francisella* besser verstehen zu können.

3. Molekularepidemiologische Studien zu *Francisella* in Deutschland

3.1. Isolate aus den Jahren 2016 - 2018

Die Tularämie ist in Deutschland eine meldepflichtige, aber selten diagnostizierte Krankheit. Es werden jährlich zwischen 20 bis 40 humane Fälle registriert (Faber 2018), wobei ein Anstieg in den letzten Jahren festzustellen ist. Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung ZBS2 (Konsiliarlabor für Tularämie) des Robert Koch-Institut angefertigt, welche die Spezialdiagnostik, die Erstellung und Pflege einer *Francisella*-Stammsammlung sowie die epidemiologische Charakterisierung der in Deutschland gefundenen *Fth* Isolate zur Aufgabe hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA von insgesamt 23 *Fth* Stämmen aus den Jahren 2016 bis 2018 molekularepidemiologisch analysiert (Abb. 36). Im Jahr 2016 wurden 41 Tularämie-Fälle in Deutschland gemeldet und es konnten sechs *Fth* Stämme isoliert werden. Demnach konnte etwa in 15 % der Fälle ein Ausbruchstamm gewonnen werden. Generell lässt sich die Diskrepanz zwischen den registrierten Fällen und den tatsächlich erhaltenen Isolaten damit erklären, dass die Antibiotikatherapie der Patienten zumeist zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits begonnen wurde. In anderen Studien wurden ähnliche Fallzahlen berichtet. Prinzipiell schwankt der Prozentsatz der gewonnen Isolate jedoch stark, zwischen unter 10 % bis über 30 % [47, 59, 64, 76, 84]. Grundsätzlich gestaltet sich die Erregerisolierung schwer und es sollte daher ein antibakterielles und antimykotisches Medium zur *Ft* Kultivierung verwendet werden, da ansonsten die langsam wachsenden *Ft* Bakterien von den Begleitorganismen „überwachsen“ werden [229]. Aus dem Grund erfolgt die Diagnose vorrangig durch den Antigen-, Antikörper- und/oder *Ft*-DNA-Nachweis (siehe I.2.3).

Zur Analyse der Stammvielfalt der *Fth* Isolate in Deutschland wurden die sequenzierten Sequenzfragmente der *Fth* Isolat-DNA an das *Fth* LVS Referenzgenom assembliert und somit eine Consensus-Sequenz und ein Entwurfsgenom generiert. Anschließend wurde ein progressives Mauve Alignment ([266], Geneious Prime) für kollineare Genome mit allen 23 *Fth* Gesamtentwurfsgenome vorgenommen. Der phylogenetische Baum (Tamura-Nei, Bootstrap-Test 100) wurde mit *Fth* OSU18 als Außengruppe und der Neighbor-Joining Methode aus dem Mauve Alignment generiert (Abb. 36). Mithilfe des canSNP-Analyseverfahrens konnten die *Fth* DNA-Sequenzen phylogenetisch weiter analysiert und eine Klassifizierung in Kladen und Subkladen vorgenommen werden [44-46]. Bei der Analyse der 23 DNA-Sequenzen traten zwei biologische Duplikate auf, die es ermöglichten das Analyseverfahren zu evaluieren. Die Proben A-988-1 und A-988-2 wurden 2016 aus unterschiedlichen Organen (Lunge, Milz) eines Hasen isoliert und die Proben A-820 und A-821 wurden ebenfalls 2016 aus einem Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion gewonnen. Diese DNA-Sequenzen gruppieren jeweils im phylogenetischen Baum und waren bei der SNP-Analyse identisch (Abb. 36), dadurch wurde das Verfahren der Sequenzprozessierung bestätigt [217]. Seit 2007 wurde in Deutschland kein weiteres B.4 *Fth* Isolat identifiziert und somit stellt der Stamm *Fth*-41 den einzigen in Deutschland gefundenen Vertreter der B.4 Klade dar (Abb. 36, [217]). Das entspricht den bereits vorhandenen Surveillance-Studien, denen zufolge dominieren in Europa und Deutschland die B.6 und B.12 *Fth* Stämme [49, 360]. Von den 23 *Fth* Isolate gruppieren die meisten (16) zur phylogenetischen B.6 Gruppe, gehören demnach zum Biovar I und sind Erythromycin-sensitiv (Abb. 36). Sechs der 23 *Fth* Isolate gruppieren zum B.12 Klade bzw. Biovar II und sind Erythromycin-resistent. Die Resistenz der Isolate gegenüber Erythromycin konnte experimentell und durch die *in silico* Analyse der *rrl* Gene bestätigt werden [48]. In der Gensequenz des dreifach im *Francisella* Genom kodierenden *rrl* Gens ist eine Mutation (A2059C) für die Erythromycin-Resistenz verantwortlich und ermöglicht somit die Diskriminierung in B.6 bzw. B.12 und demnach in Biovar I bzw. Biovar II [48]. In Europa ist eine geografische Verteilung der Biovar I und Biovar II beschrieben. Die Kladen des Biovar I (B.4 und B.6) sind vorrangig in Westeuropa verbreitet und in Nord- und Osteuropa sind größtenteils Isolate des Biovar II (Klade B.12) zu finden, wobei sich die Gebiete überlappen [1, 44, 47-49]. Wie in dieser Arbeit und in anderen Publikationen gezeigt werden konnte, gehörten die in Deutschland gefundenen Isolate zu Biovar I und II (B.6, B.12), auch hier wird eine geografische Verteilung erkennbar. Die B.6 Vertreter werden vorrangig im Südwesten Deutschlands gefunden und

die B.12 im Nordosten [217, 360]. Die weitere Klassifizierung der Isolate in den Subkladen zeigte, dass die genetische Diversität der in Deutschland gefundenen Isolate vergleichbar ist mit denen anderer europäischer Länder [49, 217, 360, 361]. Aufgrund fehlender Definition war beispielsweise die Endklassifizierung des Isolats A-1050 (nahverwandt mit B.39) nicht gegeben (Abb. 36). Generell gilt es jedoch zu diskutieren, ob eine Klassifizierung bis auf Ebene der einzelnen Isolate und somit Bildung weiterer Untergruppen von Subkladen sinnvoll ist, da einerseits die *Fth* Genome stark konserviert sind [44], aber andererseits dadurch kleine Abweichungen zu Virulenzunterschiede führen könnten.

Zwischen den Jahren 2016 und 2019 wurde aus insgesamt sechs Patienten mit einer Anamnese mit einem Zeckenbiss ein *Fth* Stamm isoliert, die alle zur B.6 Klade gruppierten. Folglich stellen Zecken auch in Deutschland *Fth* Vektoren dar und sind als potentielle Übertragungsquelle zu betrachten, wodurch andere nationale und internationale Publikationen bestätigt werden [58, 362, 363]. Aufgrund der zu geringen Isolatanzahl kann nicht von einer Assoziation der B.6 Klade mit Zecken-übertragener Tularämie ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu konnte kürzlich in Hasen eine Assoziation von Pneumonien mit B.6 *Fth* Stämmen hergestellt werden [364]. Auch die hier vorgestellten Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die pulmonalen Tularämie-Fälle in Menschen hauptsächlich durch *Fth* Isolate der B.6 Gruppe ausgelöst wurden, indes sind auch hier mehr Daten für eine eindeutige und statische Auswertung notwendig. Für die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese könnten B.6 und B.12 *Fth* Isolate vergleichend im *ex vivo* Lungeninfektionsmodell analysiert werden. Ob ein Zusammenhang zwischen den genetischen *Fth* Gruppen und der damit verbundenen Virulenz besteht, wie es beispielsweise für *Ftt* beschrieben ist, gilt es weiter zu untersuchen, z.B. durch die weitere Analyse der Gesamtgenomabgleiche [34-36]. Ebenso konnte auch keine Assoziation, z.B. zwischen einer phylogenetischen Gruppe und einem spezifischen *Fth* Vektor ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu zeigte Farlow et al., dass die Verteilung der genetischen Gruppen von *Ftt* in den USA mit der Verbreitung der *Ft* Vektoren und Wirte assoziiert ist [34]. Demnach ist der Genotyp *Ftt* AI vorwiegend im Zentrum und im Osten der USA zu finden wie auch dessen Arthropoden-Vektoren *Dermacentor variabilis* und *Amblyomma americanum* sowie Wirt *Sylvilagus floridanus*. Wohingegen der Genotyp *Ftt* AII vorrangig im Osten der USA vorkommt, wie auch *D. andersoni*, *Chrysops discalis* und *S. nuttallii*. Darüber hinaus konnte den genetischen Gruppen auch eine unterschiedliche Virulenz nachgewiesen werden. *Ftt* AI ist deutlich

virulenter (Mortalitätsrate bei A1a 4 % und bei A1b 24 %) als *Ftt* AII (Mortalitätsrate von 0 %, [34-36]).

3.2. Ein ungewöhnlicher Tularämie-Ausbruch in Deutschland

Im Oktober 2016 gab es einen ungewöhnlichen Tularämie-Ausbruch in Rheinland-Pfalz, bei dem sechs Teilnehmer einer öffentlichen Traubenlese an Tularämie erkrankten [85, 272]. Ein Patient zeigte einen schweren Krankheitsverlauf mit einer langen Antibiotika-Therapie und stationärem Aufenthalt [75]. Bei allen sechs Patienten wurde das *Francisella* LPS mittels ELISA und Western Blot Analysen nachgewiesen. Retrospektiv wurde das Konsumieren des frisch gepressten Traubenmostes bei der Traubenlese als signifikanter Prädiktor für das Erkranken an Tularämie identifiziert [272]. Zur weiteren Analyse erhielt das Konsiliarlabor für Tularämie Ausbruchs-assoziierte Proben: Süßreserve [A-856/3] und Jungwein [A856/2] der Traubensorte 1A; Jungwein der Traubensorte 1B [856/1]; Süßreserve der Traubensorte 2C [A-876/3] und Lymphknotenpunktat eines Patienten [A-877]. Aus keiner Probe gelang es ein Ausbruchsstamm zu isolieren, allerdings konnte mittels qPCR und der RD1-PCR *Fth* DNA in den Proben der Traubensorte 1A nachgewiesen werden (Abb. 37, Tab. 26, [85]). Der quantitative Vergleich zeigte, dass in den Proben der Traubensorte 1A (Jungwein, A-856/2; Süßreserve, A-856/3) große Mengen an *Ft* DNA zu finden waren, wohingegen in der Probe der Traubensorte 1B (Jungwein, A-856/1) nur noch 440 GE/ml nachweisbar waren (Tab. 26). Nach Angaben des Winzers wurde diese Traubensorte 1B direkt nach der Traubensorte 1A gepresst, somit deutet die Abnahme der *Francisella* Kopienzahl auf eine Kreuzkontamination mit *Fth* DNA möglicherweise durch das Verwenden der gleichen Traubenpresse hin. Weiter konnte ermittelt werden, dass etwa 10^9 bis 10^{10} *Fth* Bakterien rund 730 l Traubenmost kontaminierten [272].

Bei der Gesamtgenomsequenzierung der isolierten DNA aus den Proben der Traubensorte 1A wurden im Jungwein mehr kartierte Sequenzfragmente für das Hefe-Genom als in der Süßreserve (8,5 % vs. 0,5 %) gefunden, jedoch etwa gleich viele für das Genom der Weintraube (etwa 1 % nach der Hefe-Kartierung, [85]). Insgesamt konnten im Jungwein 1,9 % und in der Süßreserve 9,6 % der Sequenzfragmente mit dem *Fth* LVS Genom kartiert werden, diese deckten fast das gesamte Genom ab. Nichtsdestotrotz war auffällig, dass besonders in der Süßreserve viele nicht-kartierte Sequenzfragmente vorhanden waren. Etwa die Hälfte konnte beispielsweise Umwelt-, Boden- und Pflanzenbakterien zugeordnet werden, allerdings war die andere Hälfte der Sequenzfragmente keinem Organismus in der

anwendungsspezifischen Kraken-Software zuzuweisen. Aus den *Fth* LVS-kartierten Sequenzfragmente war es möglich eine Consensus-Sequenz und ein Entwurfsgenom zu generieren. Generell besteht die Möglichkeit, dass Entwurfsgenome geringe Mengen an hoch konservierte DNA-Bereiche aus anderen Mikroorganismen enthalten können. Ungeachtet dessen machen die Verteilung der Sequenzfragmente über das gesamte *Fth* LVS Genom und die weiteren Analysen deutlich, dass die Consensus-Sequenz und das dazugehörige Entwurfsgenom eine gute Qualität aufweisen. Die weiterführende Klassifizierung und phylogenetischen Analyse des *Fth*-Most Genoms ergaben, dass der Ausbruchsstamm ein Vertreter der B.12 Gruppe bzw. B.34 Subgruppe war (Abb. 36, [85]). Der Tularämie-Ausbruch von 2016 ereignete sich in Rheinland-Pfalz und bisher wurden dort ausschließlich Vertreter der B.6 Klade gefunden [217]. Generell wurden bislang Vertreter der B.6 Klade vermehrt im Südwesten Deutschlands registriert, wohingegen B.12 Stämme eher im Nordosten zu finden waren. Weiter wurden in den letzten fünf Jahren nur sechs Vertreter der B.34 Subklade deutschlandweit gefunden. Davon waren vier humanen und zwei tierischen Ursprungs [217].

Die Sequenzierdaten aus der Patientenprobe waren weniger gut geeignet, um eine Consensus-Sequenz zu erstellen und eine phylogenetische Klassifizierung vorzunehmen. Der Großteil (98,6 %) der Sequenzfragmente innerhalb der Patientenprobe war wie erwartet dem humanen Genom zuzuordnen. Die Kartierung mit dem *Fth* LVS bzw. *Fth*-Most Genom ergaben 691 bzw. 690 kartierte Sequenzfragmente, dennoch konnte anhand dieser festgestellt werden, dass es sich dabei ebenfalls um einen Vertreter der B.12 Gruppe handelte. Dies unterstützt zusätzlich die retrospektive Analyse, dass sich die Patienten durch das Konsumieren des Traubenmosts während der Taubenlese mit *Fth* infiziert haben. Zur Identifikation der potentiellen Kontaminationsquelle des Mosts wurde die isolierte DNA in einer Vertebraten-spezifischen PCR, die gezielt das mitochondriale Cytochrom b Gen amplifiziert, verwendet [222]. Aufgrund der hohen Kopienzahl und der hinreichenden genetischen Variabilität innerhalb der Vertebraten eignet sich das Cytochrom b Gen für diagnostische Zwecke und zur Analyse der Vertebraten-Verwandtschaftsbeziehungen [365, 366]. Neben den konservierten Bereichen der beiden Redox-Center sind ebenso Bereiche mit größerer Variabilität zu finden [367]. Das Primerpaar generiert in allen Vertebraten die gleiche PCR-Produktgröße von 623 bp und wurde ursprünglich als Kontrolle bei der Identifikation der Wirte von blutsaugenden Mücken genutzt. Das in dieser Arbeit generierte PCR-Produkt mit den Cytochrom b Primern resultierte in einer sehr schwachen PCR-DNA-Bande nach der Auftrennung im Agarosegel (Abb. 38). Ähnliches wurde

jedoch auch bei Kent et al. beobachtet [222]. Eine anschließende Klonierung, Sequenzierung und phylogenetische Analyse des PCR-Produktes aus den Proben der Traubensorte 1A wies eine DNA-Sequenz auf, die zu 99,8 % identisch zum Cytochrom b Gen der Waldmaus (*Apodemus sylvaticus* Haplotyp Germany 1 bzw. France) war. Anhand des phylogenetischen Baums wurde ersichtlich, dass der PCR-amplifizierte Bereich abzüglich der Primer (578 bp von etwa 1400 bp des gesamten Cytochrom b Gens) innerhalb der Gattung *Apodemus* konserviert ist (Abb. 39). Der Genbereich war beispielsweise zu 89 % identisch zwischen *A. sylvaticus* und *A. flavicollis*. Die Hausmaus weist jedoch bereits einen Nukleotidunterschied von 20 % zu *A. sylvaticus* auf. Dadurch kann eine Laborkontamination, z.B. durch die in anderen Versuchen verwendete murine Makrophagenzelllinie, ausgeschlossen werden. Auch das humane Cytochrom b unterscheidet sich innerhalb des PCR-amplifizierten Genbereichs zu 26 % von *A. sylvaticus*.

Die Waldmaus ernährt sich unter anderem von Samen, kleinen Insekten sowie Früchten und lebt zumeist in offenen Habitaten, wie z.B. Parks, daher wäre es denkbar, dass sich Waldmäuse in der Nähe von Weinstöcken aufhalten und Weintrauben als Nahrungsquelle nutzen [368]. Darüber hinaus zeigen viele Observationsstudien in Europa, dass *Fth* verschiedene *Apodemus* Spezies infizieren kann, wie z.B. die Brandmaus (*A. agrarius*) oder die Gelbhalsmaus (*A. flavicollis*), andererseits liegt die Prävalenz von *Fth* infizierte *A. agrarius* bei nur 0,8 %, wie eine Studie aus Kroatien zeigte [369]. Hingegen kann die *Fth* Prävalenz in endemischen Gebieten auf bis zu 10 % innerhalb der Nagetierpopulation steigen [370]. Allgemein ist eine größere *Ft* Sensibilität in einigen Mausarten beschrieben, allerdings sterben diese in der Regel nach kurzer Zeit an der Infektion und stellen somit keine Langzeitvektoren für *Ft* dar [50].

Zusammenfassend ergibt sich aus den vorgestellten Ergebnissen folgendes hypothetisches Ausbruchsszenario für den ungewöhnlichen Tularämie-Ausbruch [85]: Eine mit *Fth*-infizierte Waldmaus (lebend oder tot) wurde während der maschinellen Traubenlese der Sorte 1A mitgeerntet und zusammen mit den Weintrauben in der Weinpresse verarbeitet, wodurch eine Kontamination des Traubenmosts mit *Fth* Bakterien erfolgte. Der frisch gepresste Traubenmost wurde wiederum den Teilnehmern der Traubenlese zum Verzehr angeboten, dadurch kam es zur *Ft* Übertragung auf den Menschen. Von den acht Teilnehmern, die den Traubenmost konsumierten, erkrankten sechs an Tularämie. Der Nachweis von *Fth*-DNA in den Proben der Traubensorte 1B lässt sich dadurch erklären, dass diese direkt im Anschluss zur Traubensorte 1A in der gleichen Traubenpresse

verarbeitet wurden und es somit zu einer Kreuzkontamination kam. Der Fund von einer *Ft*-GE-Kopie in den Proben der Traubensorte 2C ist dadurch erklärbar, dass diese Traubensorte am gleichen Tag mit demselben Maischewagen geerntet wurde, dennoch ist diese Kreuzkontamination nicht gesichert, da der Nachweis von *Ft* DNA in den Proben der Traubensorte 2C grenzwertig war.

Generell sind die Fälle von oropharyngealer Tularämie häufig mit kontaminiertem Wasser oder Lebensmittel assoziiert. Bisher ereigneten sich in Europa zwei große Ausbrüche mit vorrangiger oropharyngealer Tularämie: (1) 1999 - 2000 wurden insgesamt 327 Patienten im Kosovo serologisch positiv getestet und (2) 1998 - 2003 wurden 235 bestätigten Fälle in Bulgarien gemeldet [61, 62, 371]. Häufig werden diese Ausbrüche mit unzureichenden hygienischen Bedingungen und einem ungewöhnlichen Anstieg der Nagetierpopulation in Zusammenhang gebracht [61, 62]. Ebenso kann eine Übertragung von *Ft* z.B. durch die Verarbeitung von infizierten Tieren (häufig Jagdbeute) und den Verzehr von nicht ausreichend gegartem Fleisch erfolgen [2, 59, 60]. Nichtsdestotrotz ist die Wahrscheinlichkeit sich wie hier beim Verzehr eines frisch gepressten Traubenmosts mit *Ft* zu infizieren als gering einzuschätzen, auch wenn *Fth* bekanntlich längere Zeit außerhalb des Wirtes in der Umwelt überleben kann [63]. Tests, bei denen der Süßreserve der Traubensorte 1A mit *Fth* LVS Bakterien versehen wurde, machten deutlich, dass *Fth* LVS bereits nach 24 h Inkubation nicht mehr kultivierbar war. Es wäre durchaus möglich, dass *Fth* LVS in den „Viable but nonculturable“ (VBNC) Zustand übergegangen ist. Für *Francisella* ist bekannt, dass sie bei einer Langzeitkultivierung in das VBNC Stadium übergehen können, wobei bisher noch keine „Reaktivierung“ der Bakterien erfolgreich war und außerdem sind *Francisella* in diesem Stadium avirulent [372].

Des Weiteren wird allgemein eine Häufung von Tularämie-Fällen im Spätsommer und Herbst registriert [51]. In Deutschland ist eine Häufung zwischen Juli bis November mit einem Höchststand im Oktober/November zu beobachten [2]. Der hier beschriebene Tularämie-Ausbruch fand im Oktober statt und liegt demnach in der „Tularämie-Saison“. Das saisonale Auftreten von Tularämie-Fällen wird jedoch nicht in allen Ländern beobachtet, dennoch konnte ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Vektor- bzw. Wirtspopulationen von *Ft* und der Häufung von Tularämie-Fällen festgestellt werden [51, 61]. Beispielsweise treten in Schweden vermehrt Tularämie-Fälle im August/September infolge der Zunahme der Moskitopopulation auf [373].

Zusammenfassend macht dieser Fall deutlich, dass von rohen und unverarbeiteten Lebensmitteln das Potential ausgeht Krankheitserreger, insbesondere auch *Fth*, zu

übertragen. Daher sollten gewissen Standards eingehalten werden. Generell wird das Pasteurisieren von Lebensmitteln vor dem Verzehr empfohlen. Für *Francisella* konnte gezeigt werden, dass das Erhitzen auf 58 °C für einige Minuten oder die Hochdruckverarbeitung mit 500 MPa für eine erfolgreiche Inaktivierung der Krankheitserreger in flüssigen Lebensmitteln zur Folge hat [374, 375]. Im Falle einer Traubenlese sollten beispielsweise nur noch handgelesene Trauben für den zum Verzehr gedachten Traubenmost verwendet und weitere Reinigungsschritte der Erntegeräten eingeführt werden. Weiter macht dieser Fall deutlich, dass besonders in Krankheitsfällen mit einer ähnlichen Anamnese bzw. Exposition zu ungekochten Lebensmitteln an die Möglichkeit einer Tularämie gedacht werden sollte, sodass eine schnelle Diagnose gestellt werden kann.

4. Fazit

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung des neuen aquatischen Umweltisolats F-W12. Bisher konnte zwar keine intrazelluläre Replikation des neuen aquatischen Umweltisolats F-W12 in einer möglichen Wirtszelle nachgewiesen werden, allerdings persistiert der Stamm in Makrophagen, Alveolarepithelzellen, *A. lenticulata* und im humanen Lungengewebe. Außerdem konnten mithilfe des Scatterscreens putative Virulenz-fördernde Faktoren in F-W12 identifiziert werden, die bereits in anderen pathogenen Bakterien die Virulenz maßgeblich beeinflussen. Damit liefert diese Arbeit wichtige Erkenntnisse, die zur Pathogenitätseinschätzung des F-W12 Stammes genutzt werden können. Momentan ist der Stamm aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft zu *Allofrancisella* in die Risikogruppe 1 gemäß der Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 466 eingestuft. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist eine Pathogenität des F-W12 Stammes zumindest nicht grundsätzlich auszuschließen. Darüber hinaus sollten speziell Insekten als potentiell Habitat oder potentiellen Wirt für den F-W12 Stamm bei der Wirtssuche getestet werden. Ebenso ist die Analyse des putativen T6SS von F-W12 weiterhin sinnvoll, da einerseits das T6SS den Hauptvirulenzfaktor von *Francisella* darstellt und andererseits noch kein Sekretionssystem für den Stamm beschrieben ist.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte humane *ex vivo* Lungeninfektionsmodell ermöglicht eine differenzierte Analyse von *Francisella* Stämme in einem komplexen dreidimensionalen System, in dem der attenuierte Phänotyp des *Fth* LVS erkennbar wird, gleichwohl die Identifikation der primär-infizierten Zelltypen und die Analyse des Chemokin- und Zytokinprofils der humanen Lunge noch ausstehen. Das System bietet

neue Möglichkeiten, um die Interaktion von *Francisella* und der humanen Lunge analysieren zu können, und kann neben der Analyse zur *Ft* Replikation und Immunreaktion des Wirts, u.a. zur Untersuchung des intrazellulären Stoffwechsels von *Francisella* genutzt werden.

Darüber hinaus sind die Untersuchungen zum Vorkommen von *Francisella* in der Umwelt und die daraus resultierenden Gefahren für den Menschen notwendig, wie der hier geschilderte ungewöhnliche Tularämie-Ausbruch verdeutlicht. Ebenso ist die Charakterisierung der *Fth* Isolate für die Analyse der Stammvielfalt und die damit evtl. verbundenen Virulenzunterschiede einzelner Subkladen essentiell, jedoch ist hierfür eine größere Anzahl an *Fth* Isolaten erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Ellis, J., Oyston, P.C., Green, M., and Titball, R.W., Tularemia. *Clin Microbiol Rev*, 2002. **15**(4): p. 631-46.
2. Faber, M., Heuner, K., Jacob, D., and Grunow, R., Tularemia in Germany-A Re-emerging Zoonosis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018. **8**: p. 40.
3. Sjöstedt, A., Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 1-29.
4. McCoy, G.W. and Chapin, C.W., Further Observations on a Plague-Like Disease of Rodents with a Preliminary Note on the Causative Agent, Bacterium Tularensis. *The Journal of Infectious Diseases*, 1912. **10**(1): p. 61-72.
5. Wherry, W.B. and Lamb, B.H., Infection of man with Bacterium tularensis. 1914. *J Infect Dis*, 2004. **189**(7): p. 1321-9.
6. Oyston, P.C., Sjöstedt, A., and Titball, R.W., Tularemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis. *Nat Rev Microbiol*, 2004. **2**(12): p. 967-78.
7. Maurin, M., Francisella tularensis as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015. **13**(2): p. 141-4.
8. Saslaw, S. and Carlisle, H.N., Studies with tularemia vaccines in volunteers. IV. Brucella agglutinins in vaccinated and nonvaccinated volunteers challenged with Pasteurella tularensis. *Am J Med Sci*, 1961. **242**: p. 166-72.
9. Saslaw, S., Carlisle, H.N., and Hinchliffe, V., Studies with tularemia vaccines in volunteers. V. Immunodiffusion studies with Pasteurella tularensis antigen-human antibody systems. *Am J Med Sci*, 1962. **244**: p. 175-85.
10. Gao, B., Mohan, R., and Gupta, R.S., Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009. **59**(Pt 2): p. 234-47.
11. Qu, P.H., Li, Y., Salam, N., Chen, S.Y., Liu, L., Gu, Q., Fang, B.Z., Xiao, M., Li, M., Chen, C., and Li, W.J., Allofrancisella inopinata gen. nov., sp. nov. and Allofrancisella frigidaquae sp. nov., isolated from water-cooling systems, and transfer of Francisella guangzhouensis Qu et al. 2013 to the new genus as Allofrancisella guangzhouensis comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016. **66**(11): p. 4832-4838.
12. Schrällhammer, M., Schweikert, M., Vallesi, A., Verni, F., and Petroni, G., Detection of a novel subspecies of Francisella noatunensis as endosymbiont of the ciliate Euplotes raikovi. *Microb Ecol*, 2011. **61**(2): p. 455-64.
13. Vallesi, A., Sjödin, A., Petrelli, D., Luporini, P., Taddei, A.R., Thelaus, J., Ohrman, C., Nilsson, E., Di Giuseppe, G., Gutierrez, G., and Villalobo, E., A New Species of the gamma-Proteobacterium Francisella, F. adeliensis Sp. Nov., Endocytobiont in an Antarctic Marine Ciliate and Potential Evolutionary Forerunner of Pathogenic Species. *Microb Ecol*, 2019. **77**(3): p. 587-596.
14. Larson, M.A., Nalbantoglu, U., Sayood, K., Zentz, E.B., Cer, R.Z., Iwen, P.C., Francesconi, S.C., Bishop-Lilly, K.A., Mokashi, V.P., Sjöstedt, A., and Hinrichs, S.H., Reclassification of Wolbachia persica as Francisella persica comb. nov. and emended description of the family Francisellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016. **66**(3): p. 1200-1205.
15. Brevik, O.J., Ottem, K.F., Kamaishi, T., Watanabe, K., and Nylund, A., Francisella haliotica sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (Haliotis gigantea) in Japan. *J Appl Microbiol*, 2011. **111**(5): p. 1044-56.
16. Hollis, D.G., Weaver, R.E., Steigerwalt, A.G., Wenger, J.D., Moss, C.W., and Brenner, D.J., Francisella philomiragia comb. nov. (formerly Yersinia philomiragia) and Francisella tularensis biogroup novicida (formerly Francisella novicida) associated with human disease. *J Clin Microbiol*, 1989. **27**(7): p. 1601-8.
17. Huber, B., Escudero, R., Busse, H.J., Seibold, E., Scholz, H.C., Anda, P., Kampf, P., and Spletstoeser, W.D., Description of Francisella hispaniensis sp. nov., isolated from human blood, reclassification of Francisella novicida (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as Francisella tularensis subsp. novicida comb. nov. and emended description of the genus Francisella. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010. **60**(Pt 8): p. 1887-96.
18. Jensen, W.I., Owen, C.R., and Jellison, W.L., Yersinia philomiragia sp. n., a new member of the Pasteurella group of bacteria, naturally pathogenic for the muskrat (Ondatra zibethica). *J Bacteriol*, 1969. **100**(3): p. 1237-41.
19. Larson, C.L., Wicht, W., and Jellison, W.L., A new organism resembling P. tularensis isolated from water. *Public Health Rep*, 1955. **70**(3): p. 253-8.

20. Soto, E., Griffin, M.J., Morales, J.A., Calvo, E.B., de Alexandre Sebastiao, F., Porras, A.L., Viquez-Rodriguez, X., Reichley, S.R., Rosser, T.G., Ware, C., Byrne, B.A., Garcia, J.C., LaFrentz, B.R., and Camus, A.C., *Francisella marina* sp. nov., Etiologic Agent of Systemic Disease in Cultured Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*) in Central America. *Appl Environ Microbiol*, 2018. **84**(16).
21. Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Moller, A., and Kamaishi, T., Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J Appl Microbiol*, 2009. **106**(4): p. 1231-43.
22. Challacombe, J.F., Petersen, J.M., Gallegos-Graves, V., Hodge, D., Pillai, S., and Kuske, C.R., Whole-Genome Relationships among *Francisella* Bacteria of Diverse Origins Define New Species and Provide Specific Regions for Detection. *Appl Environ Microbiol*, 2017. **83**(3).
23. Mikalsen, J. and Colquhoun, D.J., *Francisella asiatica* sp. nov. isolated from farmed tilapia (*Oreochromis* sp.) and elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to species rank as *Francisella noatunensis* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009.
24. Mikalsen, J., Olsen, A.B., Rudra, H., Moldal, T., Lund, H., Djonne, B., Bergh, O., and Colquhoun, D.J., Virulence and pathogenicity of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* for Atlantic cod, *Gadus morhua* L., and laboratory mice. *J Fish Dis*, 2009. **32**(4): p. 377-81.
25. Mikalsen, J., Olsen, A.B., Tengs, T., and Colquhoun, D.J., *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007. **57**(Pt 9): p. 1960-5.
26. Olsen, A.B., Mikalsen, J., Rode, M., Alfjorden, A., Hoel, E., Straum-Lie, K., Haldorsen, R., and Colquhoun, D.J., A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *J Fish Dis*, 2006. **29**(5): p. 307-11.
27. Clarridge, J.E., 3rd, Raich, T.J., Sjosted, A., Sandstrom, G., Darouiche, R.O., Shawar, R.M., Georgioui, P.R., Osting, C., and Vo, L., Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. *J Clin Microbiol*, 1996. **34**(8): p. 1995-2000.
28. Sicherer, S.H., Asturias, E.J., Winkelstein, J.A., Dick, J.D., and Willoughby, R.E., *Francisella philomiragia* sepsis in chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. **16**(4): p. 420-2.
29. Polack, F.P., Harrington, S.M., Winkelstein, J.A., Merz, W.G., and Willoughby, R.E., Recurrent *Francisella philomiragia* sepsis in chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis J*, 1998. **17**(5): p. 442-3.
30. Robles-Marhuenda, A., Vaca, M., Romero, P., Ferreira, A., Lopez-Granados, E., and Arnalich, F., *Francisella philomiragia*: Think of Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol*, 2018. **38**(3): p. 257-259.
31. Forsman, M., Sandstrom, G., and Sjostedt, A., Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol*, 1994. **44**(1): p. 38-46.
32. Kingry, L.C. and Petersen, J.M., Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. **4**: p. 35.
33. Larson, M.A., Sayood, K., Bartling, A.M., Meyer, J.R., Starr, C., Baldwin, J., and Dempsey, M.P., Differentiation of *Francisella tularensis* Subspecies and Subtypes. *J Clin Microbiol*, 2020.
34. Farlow, J., Wagner, D.M., Dukerich, M., Stanley, M., Chu, M., Kubota, K., Petersen, J., and Keim, P., *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(12): p. 1835-41.
35. Staples, J.E., Kubota, K.A., Chalcraft, L.G., Mead, P.S., and Petersen, J.M., Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964-2004. *Emerg Infect Dis*, 2006. **12**(7): p. 1113-8.
36. Kugeler, K.J., Mead, P.S., Janusz, A.M., Staples, J.E., Kubota, K.A., Chalcraft, L.G., and Petersen, J.M., Molecular Epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin Infect Dis*, 2009. **48**(7): p. 863-70.
37. Aravena-Roman, M., Merritt, A., and Inglis, T.J., First case of *Francisella* bacteraemia in Western Australia. *New Microbes New Infect*, 2015. **8**: p. 75-7.
38. Eden, J.S., Rose, K., Ng, J., Shi, M., Wang, Q., Sintchenko, V., and Holmes, E.C., *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Ringtail Possums, Australia. *Emerg Infect Dis*, 2017. **23**(7): p. 1198-1201.
39. Jackson, J., McGregor, A., Cooley, L., Ng, J., Brown, M., Ong, C.W., Darcy, C., and Sintchenko, V., *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*, Tasmania, Australia, 2011. *Emerg Infect Dis*, 2012. **18**(9): p. 1484-6.

40. Whipp, M.J., Davis, J.M., Lum, G., de Boer, J., Zhou, Y., Bearden, S.W., Petersen, J.M., Chu, M.C., and Hogg, G., Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J Med Microbiol*, 2003. **52**(Pt 9): p. 839-42.
41. Keim, P., Johansson, A., and Wagner, D.M., Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 30-66.
42. Wang, Y., Peng, Y., Hai, R., Xia, L., Li, H., Zhang, Z., Cai, H., Liang, Y., Shen, X., Yu, D., Birdsell, D., Wagner, D.M., and Keim, P., Diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* lineages, China. *Emerg Infect Dis*, 2014. **20**(7): p. 1191-4.
43. Gürcan, S., Epidemiology of tularemia. *Balkan Med J*, 2014. **31**(1): p. 3-10.
44. Vogler, A.J., Birdsell, D., Price, L.B., Bowers, J.R., Beckstrom-Sternberg, S.M., Auerbach, R.K., Beckstrom-Sternberg, J.S., Johansson, A., Clare, A., Buchhagen, J.L., Petersen, J.M., Pearson, T., Vaissaire, J., Dempsey, M.P., Foxall, P., Engelthaler, D.M., Wagner, D.M., and Keim, P., Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J Bacteriol*, 2009. **191**(8): p. 2474-84.
45. Karlsson, E., Svensson, K., Lindgren, P., Bystrom, M., Sjodin, A., Forsman, M., and Johansson, A., The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of Eurosiberian tularaemia. *Environ Microbiol*, 2013. **15**(2): p. 634-45.
46. Svensson, K., Granberg, M., Karlsson, L., Neubauerova, V., Forsman, M., and Johansson, A., A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8360.
47. Svensson, K., Back, E., Eliasson, H., Berglund, L., Granberg, M., Karlsson, L., Larsson, P., Forsman, M., and Johansson, A., Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg Infect Dis*, 2009. **15**(12): p. 1937-47.
48. Karlsson, E., Golovliov, I., Larkeryd, A., Granberg, M., Larsson, E., Ohrman, C., Niemcewicz, M., Birdsell, D., Wagner, D.M., Forsman, M., and Johansson, A., Clonality of erythromycin resistance in *Francisella tularensis*. *J Antimicrob Chemother*, 2016. **71**(10): p. 2815-23.
49. Gyuranecz, M., Birdsell, D.N., Splettstoesser, W., Seibold, E., Beckstrom-Sternberg, S.M., Makrai, L., Fodor, L., Fabbri, M., Vicari, N., Johansson, A., Busch, J.D., Vogler, A.J., Keim, P., and Wagner, D.M., Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg Infect Dis*, 2012. **18**(2): p. 290-3.
50. Friend, M., Tularemia. 1 ed, ed. C. 1297. 2006: *USGS National Wildlife Health Center in cooperation with the U.S. Fish and Wildlife Service*.
51. Hestvik, G., Warns-Petit, E., Smith, L.A., Fox, N.J., Uhlhorn, H., Artois, M., Hannant, D., Hutchings, M.R., Mattsson, R., Yon, L., and Gavrier-Widen, D., The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiol Infect*, 2015. **143**(10): p. 2137-60.
52. Gyuranecz, M., Rigo, K., Dan, A., Foldvari, G., Makrai, L., Denes, B., Fodor, L., Majoros, G., Tirjak, L., and Erdelyi, K., Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an inter-epizootic period. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011. **11**(8): p. 1031-5.
53. Weinberg, A.N. and Branda, J.A., Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 31-2010. A 29-year-old woman with fever after a cat bite. *N Engl J Med*, 2010. **363**(16): p. 1560-8.
54. Kwit, N.A., Schwartz, A., Kugeler, K.J., Mead, P.S., and Nelson, C.A., Human tularaemia associated with exposure to domestic dogs-United States, 2006-2016. *Zoonoses Public Health*, 2019. **66**(4): p. 417-421.
55. Senol, M., Ozcan, A., Karıncaoglu, Y., Aydin, A., and Ozerol, I.H., Tularemia: a case transmitted from a sheep. *Cutis*, 1999. **63**(1): p. 49-51.
56. Mauel, M.J., Soto, E., Moralis, J.A., and Hawke, J., A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *J Aquat Anim Health*, 2007. **19**(1): p. 27-34.
57. Soto, E., Hawke, J.P., Fernandez, D., and Morales, J.A., *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *J Fish Dis*, 2009. **32**(8): p. 713-22.
58. Gehringer, H., Schacht, E., Maylaender, N., Zeman, E., Kaysser, P., Oehme, R., Pluta, S., and Splettstoesser, W.D., Presence of an emerging subclone of *Francisella tularensis* *holarctica* in Ixodes ricinus ticks from south-western Germany. *Ticks Tick Borne Dis*, 2013. **4**(1-2): p. 93-100.
59. Maurin, M. and Gyuranecz, M., Tularaemia: clinical aspects in Europe. *Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(1): p. 113-124.
60. Hauri, A.M., Hofstetter, I., Seibold, E., Kaysser, P., Eckert, J., Neubauer, H., and Splettstoesser, W.D., Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg Infect Dis*, 2010. **16**(2): p. 238-43.
61. Grunow, R., Kalaveshi, A., Kuhn, A., Mulliqi-Osmani, G., and Ramadani, N., Surveillance of tularaemia in Kosovo, 2001 to 2010. *Euro Surveill*, 2012. **17**(28).
62. Reintjes, R., Dedushaj, I., Gjini, A., Jorgensen, T.R., Cotter, B., Lieftucht, A., D'Ancona, F., Dennis, D.T., Kosoy, M.A., Mulliqi-Osmani, G., Grunow, R., Kalaveshi, A., Gashi, L., and Humolli, I.,

- Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg Infect Dis*, 2002. **8**(1): p. 69-73.
63. Sinclair, R., Boone, S.A., Greenberg, D., Keim, P., and Gerba, C.P., Persistence of category A select agents in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 2008. **74**(3): p. 555-63.
 64. Hepburn, M.J. and Simpson, A.J., Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008. **6**(2): p. 231-40.
 65. World Health, O., WHO Guidelines on tularaemia. 2007, *World Health Organization*: Geneva.
 66. Kantardjiev, T., Padeshki, P., and Ivanov, I.N., Diagnostic approaches for oculoglandular tularemia: advantages of PCR. *Br J Ophthalmol*, 2007. **91**(9): p. 1206-8.
 67. Gill, V. and Cunha, B.A., Tularemia pneumonia. *Semin Respir Infect*, 1997. **12**(1): p. 61-7.
 68. Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Friedlander, A.M., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S.R., McDade, J.E., Osterholm, M.T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K., and Tonat, K., Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *Jama*, 2001. **285**(21): p. 2763-73.
 69. Mambie, A., Wallet, F., Scherman, L., Armand, S., Vervelle, C., Faure, K., Guery, B., Titecat, M., and Loiez, C., Neither Neoplasia Nor Tuberculosis, but Francisella. *Open Forum Infect Dis*, 2016. **3**(2): p. ofw080.
 70. Bloch-Infanger, C., Furrer, K., Wiese, M., Hiebinger, A., Bucher, C.M., Kopp, S., Hinic, V., and Goldenberger, D., An unexpected cause for cavitary pneumonia and empyema. *Infection*, 2016. **44**(4): p. 539-41.
 71. Gyuranecz, M., Szeredi, L., Makrai, L., Fodor, L., Meszaros, A.R., Szepe, B., Fuleki, M., and Erdelyi, K., Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet Pathol*, 2010. **47**(5): p. 958-63.
 72. Schulze, C., Heuner, K., Myrtennas, K., Karlsson, E., Jacob, D., Kutzer, P., K, G.R., Forsman, M., and Grunow, R., High and novel genetic diversity of Francisella tularensis in Germany and indication of environmental persistence. *Epidemiol Infect*, 2016. **144**(14): p. 3025-3036.
 73. Colquhoun, D.J. and Duodu, S., Francisella infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet Res*, 2011. **42**: p. 47.
 74. Birkbeck, T.H., Feist, S.W., and Verner-Jeffreys, D.W., Francisella infections in fish and shellfish. *J Fish Dis*, 2011. **34**(3): p. 173-87.
 75. Wetzstein, N., Karcher, I., Kupper-Tetzl, C.P., Kann, G., Hogardt, M., Jozsa, K., Jacob, D., Grunow, R., Just-Nubling, G., and Wolf, T., Clinical characteristics in a sentinel case as well as in a cluster of tularemia patients associated with grape harvest. *Int J Infect Dis*, 2019. **84**: p. 116-120.
 76. Tarnvik, A. and Chu, M.C., New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 378-404.
 77. Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Bystrom, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjostedt, A., Titball, R.W., and Forsman, M., Genome-wide DNA microarray analysis of Francisella tularensis strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent F. tularensis subsp. tularensis. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(7): p. 2924-31.
 78. Antunes, N.T., Frase, H., Toth, M., and Vakulenko, S.B., The class A beta-lactamase FTU-1 is native to Francisella tularensis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(2): p. 666-71.
 79. Eigelsbach, H.T. and Downs, C.M., Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. *J Immunol*, 1961. **87**: p. 415-25.
 80. Tigertt, W.D., Soviet viable Pasteurella tularensis vaccines. A review of selected articles. *Bacteriol Rev*, 1962. **26**: p. 354-73.
 81. Splettstoesser, W.D., Piechotowski, I., Buckendahl, A., Frangoulidis, D., Kaysser, P., Kratzer, W., Kimmig, P., Seibold, E., and Brockmann, S.O., Tularemia in Germany: the tip of the iceberg? *Epidemiol Infect*, 2009. **137**(5): p. 736-43.
 82. Tarnvik, A., Priebe, H.S., and Grunow, R., Tularaemia in Europe: an epidemiological overview. *Scand J Infect Dis*, 2004. **36**(5): p. 350-5.
 83. Anda, P., Segura del Pozo, J., Diaz Garcia, J.M., Escudero, R., Garcia Pena, F.J., Lopez Velasco, M.C., Sellek, R.E., Jimenez Chillaron, M.R., Sanchez Serrano, L.P., and Martinez Navarro, J.F., Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg Infect Dis*, 2001. **7**(3 Suppl): p. 575-82.
 84. Perez-Castrillon, J.L., Bachiller-Luque, P., Martin-Luquero, M., Mena-Martin, F.J., and Herreros, V., Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis*, 2001. **33**(4): p. 573-6.
 85. Jacob, D., Köppen, K., Radonic, A., Haldemann, B., Zanger, P., Heuner, K., and Grunow, R., Molecular identification of the source of an uncommon tularaemia outbreak, Germany, autumn 2016. *Euro Surveill*, 2019. **24**(18).

86. Ben Nasr, A., Haithcoat, J., Masterson, J.E., Gunn, J.S., Eaves-Pyles, T., and Klimpel, G.R., Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(4): p. 774-86.
87. Ben Nasr, A. and Klimpel, G.R., Subversion of complement activation at the bacterial surface promotes serum resistance and opsonophagocytosis of *Francisella tularensis*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(1): p. 77-85.
88. Rus, H., Cudrici, C., and Niculescu, F., The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res*, 2005. **33**(2): p. 103-12.
89. Sandström, G., Löfgren, S., and Tärnvik, A., A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*, 1988. **56**(5): p. 1194-202.
90. Sorokin, V.M., Pavlovich, N.V., and Prozorova, L.A., *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1996. **13**(3): p. 249-52.
91. Brock, S.R. and Parmely, M.J., *Francisella tularensis* Confronts the Complement System. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 523.
92. Moreau, G.B. and Mann, B.J., Adherence and uptake of *Francisella* into host cells. *Virulence*, 2013. **4**(8): p. 826-32.
93. Law, H.T., Lin, A.E., Kim, Y., Quach, B., Nano, F.E., and Guttman, J.A., *Francisella tularensis* uses cholesterol and clathrin-based endocytic mechanisms to invade hepatocytes. *Sci Rep*, 2011. **1**: p. 192.
94. Horzempa, J., O'Dee, D.M., Stolz, D.B., Franks, J.M., Clay, D., and Nau, G.J., Invasion of erythrocytes by *Francisella tularensis*. *J Infect Dis*, 2011. **204**(1): p. 51-9.
95. Craven, R.R., Hall, J.D., Fuller, J.R., Taft-Benz, S., and Kawula, T.H., *Francisella tularensis* invasion of lung epithelial cells. *Infect Immun*, 2008. **76**(7): p. 2833-42.
96. Schwartz, J.T., Barker, J.H., Long, M.E., Kaufman, J., McCracken, J., and Allen, L.A., Natural IgM mediates complement-dependent uptake of *Francisella tularensis* by human neutrophils via complement receptors 1 and 3 in nonimmune serum. *J Immunol*, 2012. **189**(6): p. 3064-77.
97. Celli, J. and Zahrt, T.C., Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(4): p. a010314.
98. Tonjum, T. and Koomey, M., The pilus colonization factor of pathogenic neisserial species: organelle biogenesis and structure/function relationships--a review. *Gene*, 1997. **192**(1): p. 155-63.
99. Mattick, J.S., Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 2002. **56**: p. 289-314.
100. Rowe, H.M. and Huntley, J.F., From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015. **5**: p. 94.
101. Chakraborty, S., Monfett, M., Maier, T.M., Benach, J.L., Frank, D.W., and Thanassi, D.G., Type IV pili in *Francisella tularensis*: roles of pilF and pilT in fiber assembly, host cell adherence, and virulence. *Infect Immun*, 2008. **76**(7): p. 2852-61.
102. Forslund, A.L., Salomonsson, E.N., Golovliov, I., Kuoppa, K., Michell, S., Titball, R., Oyston, P., Noppa, L., Sjostedt, A., and Forsberg, A., The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *BMC Microbiol*, 2010. **10**: p. 227.
103. Hager, A.J., Bolton, D.L., Pelletier, M.R., Brittnacher, M.J., Gallagher, L.A., Kaul, R., Skerrett, S.J., Miller, S.I., and Guina, T., Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol Microbiol*, 2006. **62**(1): p. 227-37.
104. Salomonsson, E.N., Forslund, A.L., and Forsberg, A., Type IV Pili in *Francisella* - A Virulence Trait in an Intracellular Pathogen. *Front Microbiol*, 2011. **2**: p. 29.
105. Zogaj, X., Chakraborty, S., Liu, J., Thanassi, D.G., and Klose, K.E., Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida* type IV pilus. *Microbiology*, 2008. **154**(Pt 7): p. 2139-2150.
106. Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A., *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun*, 2005. **73**(9): p. 5892-902.
107. Schulert, G.S. and Allen, L.A., Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(3): p. 563-71.
108. Kubelkova, K. and Macela, A., Innate Immune Recognition: An Issue More Complex Than Expected. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019. **9**: p. 241.
109. Bradburne, C.E., Verhoeven, A.B., Manyam, G.C., Chaudhry, S.A., Chang, E.L., Thach, D.C., Bailey, C.L., and van Hoek, M.L., Temporal transcriptional response during infection of type II alveolar epithelial cells with *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) supports a general host suppression and bacterial uptake by macropinocytosis. *J Biol Chem*, 2013. **288**(15): p. 10780-91.
110. Clemens, D.L. and Horwitz, M.A., Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 160-86.

111. Santic, M., Molmeret, M., Klose, K.E., and Abu Kwaik, Y., Francisella tularensis travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol*, 2006. **14**(1): p. 37-44.
112. Lindemann, S.R., McLendon, M.K., Apicella, M.A., and Jones, B.D., An in vitro model system used to study adherence and invasion of Francisella tularensis live vaccine strain in nonphagocytic cells. *Infect Immun*, 2007. **75**(6): p. 3178-82.
113. Kerr, M.C. and Teasdale, R.D., Defining macropinocytosis. *Traffic*, 2009. **10**(4): p. 364-71.
114. Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., and Ullmann, U., Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Vol. 5., Auflage. 2004: *Springer Verlag*.
115. Schütt, C. and Bröker, B., Grundwissen Immunologie. Vol. 2. Auflage. 2009: *Spektrum Akademischer Verlag*.
116. Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A., Virulent and avirulent strains of Francisella tularensis prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun*, 2004. **72**(6): p. 3204-17.
117. Asare, R. and Abu Kwaik, Y., Molecular complexity orchestrates modulation of phagosome biogenesis and escape to the cytosol of macrophages by Francisella tularensis. *Environ Microbiol*, 2010. **12**(9): p. 2559-86.
118. Fortier, A.H., Green, S.J., Polsinelli, T., Jones, T.R., Crawford, R.M., Leiby, D.A., Elkins, K.L., Meltzer, M.S., and Nacy, C.A., Life and death of an intracellular pathogen: Francisella tularensis and the macrophage. *Immunol Ser*, 1994. **60**: p. 349-61.
119. McCaffrey, R.L., Schwartz, J.T., Lindemann, S.R., Moreland, J.G., Buchan, B.W., Jones, B.D., and Allen, L.A., Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B Francisella tularensis. *J Leukoc Biol*, 2010. **88**(4): p. 791-805.
120. Chong, A., Wehrly, T.D., Nair, V., Fischer, E.R., Barker, J.R., Klose, K.E., and Celli, J., The early phagosomal stage of Francisella tularensis determines optimal phagosomal escape and Francisella pathogenicity island protein expression. *Infect Immun*, 2008. **76**(12): p. 5488-99.
121. Wehrly, T.D., Chong, A., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Child, R., Edwards, J.A., Brouwer, D., Nair, V., Fischer, E.R., Wicke, L., Curda, A.J., Kupko, J.J., 3rd, Martens, C., Crane, D.D., Bosio, C.M., Porcella, S.F., and Celli, J., Intracellular biology and virulence determinants of Francisella tularensis revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell Microbiol*, 2009. **11**(7): p. 1128-50.
122. Golovliov, I., Sjöstedt, A., Mokrievich, A., and Pavlov, V., A method for allelic replacement in Francisella tularensis. *FEMS Microbiol Lett*, 2003. **222**(2): p. 273-80.
123. Santic, M., Molmeret, M., Klose, K.E., Jones, S., and Kwaik, Y.A., The Francisella tularensis pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol*, 2005. **7**(7): p. 969-79.
124. Brodmann, M., Dreier, R.F., Broz, P., and Basler, M., Francisella requires dynamic type VI secretion system and ClpB to deliver effectors for phagosomal escape. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15853.
125. Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A., The Francisella Type VI Secretion System. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018. **8**: p. 121.
126. Steele, S., Radlinski, L., Taft-Benz, S., Brunton, J., and Kawula, T.H., Trophocytosis-associated cell to cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Elife*, 2016. **5**.
127. Steele, S.P., Chamberlain, Z., Park, J., and Kawula, T.H., Francisella tularensis enters a double membraned compartment following cell-cell transfer. *Elife*, 2019. **8**.
128. Bosio, C.M., Bielefeldt-Ohmann, H., and Belisle, J.T., Active suppression of the pulmonary immune response by Francisella tularensis Schu4. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4538-47.
129. Hall, J.D., Woolard, M.D., Gunn, B.M., Craven, R.R., Taft-Benz, S., Frelinger, J.A., and Kawula, T.H., Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of Francisella tularensis Schu S4, LVS, or U112. *Infect Immun*, 2008. **76**(12): p. 5843-52.
130. Roberts, L.M., Powell, D.A., and Frelinger, J.A., Adaptive Immunity to Francisella tularensis and Considerations for Vaccine Development. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018. **8**: p. 115.
131. Mares, C.A., Ojeda, S.S., Morris, E.G., Li, Q., and Teale, J.M., Initial delay in the immune response to Francisella tularensis is followed by hypercytokinemia characteristic of severe sepsis and correlating with upregulation and release of damage-associated molecular patterns. *Infect Immun*, 2008. **76**(7): p. 3001-10.
132. Bröms, J.E., Sjöstedt, A., and Lavander, M., The Role of the Francisella Tularensis Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. *Front Microbiol*, 2010. **1**: p. 136.
133. Forestal, C.A., Malik, M., Catlett, S.V., Savitt, A.G., Benach, J.L., Sellati, T.J., and Furie, M.B., Francisella tularensis has a significant extracellular phase in infected mice. *J Infect Dis*, 2007. **196**(1): p. 134-7.

134. Yu, J.J., Raulie, E.K., Murthy, A.K., Guentzel, M.N., Klose, K.E., and Arulanandam, B.P., The presence of infectious extracellular *Francisella tularensis* subsp. *novicida* in murine plasma after pulmonary challenge. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008. **27**(4): p. 323-5.
135. Elkins, K.L., Bosio, C.M., and Rhinehart-Jones, T.R., Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect Immun*, 1999. **67**(11): p. 6002-7.
136. Roberts, L.M., Crane, D.D., Wehrly, T.D., Fletcher, J.R., Jones, B.D., and Bosio, C.M., Inclusion of Epitopes That Expand High-Avidity CD4+ T Cells Transforms Subprotective Vaccines to Efficacious Immunogens against Virulent *Francisella tularensis*. *J Immunol*, 2016. **197**(7): p. 2738-47.
137. Hood, A.M., Virulence factors of *Francisella tularensis*. *J Hyg (Lond)*, 1977. **79**(1): p. 47-60.
138. Apicella, M.A., Post, D.M., Fowler, A.C., Jones, B.D., Rasmussen, J.A., Hunt, J.R., Imagawa, S., Choudhury, B., Inzana, T.J., Maier, T.M., Frank, D.W., Zahrt, T.C., Chaloner, K., Jennings, M.P., McLendon, M.K., and Gibson, B.W., Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11060.
139. Lindemann, S.R., Peng, K., Long, M.E., Hunt, J.R., Apicella, M.A., Monack, D.M., Allen, L.A., and Jones, B.D., *Francisella tularensis* Schu S4 O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages. *Infect Immun*, 2011. **79**(2): p. 581-94.
140. Bandara, A.B., Champion, A.E., Wang, X., Berg, G., Apicella, M.A., McLendon, M., Azadi, P., Snyder, D.S., and Inzana, T.J., Isolation and mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e19003.
141. Prior, J.L., Prior, R.G., Hitchen, P.G., Diaper, H., Griffin, K.F., Morris, H.R., Dell, A., and Titball, R.W., Characterization of the O antigen gene cluster and structural analysis of the O antigen of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *J Med Microbiol*, 2003. **52**(Pt 10): p. 845-51.
142. Vinogradov, E., Conlan, W.J., Gunn, J.S., and Perry, M.B., Characterization of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr Res*, 2004. **339**(3): p. 649-54.
143. Vinogradov, E. and Perry, M.B., Characterisation of the core part of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr Res*, 2004. **339**(9): p. 1643-8.
144. Vinogradov, E., Perry, M.B., and Conlan, J.W., Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(24): p. 6112-8.
145. Thomas, R.M., Titball, R.W., Oyston, P.C., Griffin, K., Waters, E., Hitchen, P.G., Michell, S.L., Grice, I.D., Wilson, J.C., and Prior, J.L., The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infect Immun*, 2007. **75**(1): p. 371-8.
146. Okan, N.A. and Kasper, D.L., The atypical lipopolysaccharide of *Francisella*. *Carbohydr Res*, 2013. **378**: p. 79-83.
147. Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A., O-antigen-deficient *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain mutants are ingested via an aberrant form of looping phagocytosis and show altered kinetics of intracellular trafficking in human macrophages. *Infect Immun*, 2012. **80**(3): p. 952-67.
148. Zarrella, T.M., Singh, A., Bitsakis, C., Rahman, T., Sahay, B., Feustel, P.J., Gosselin, E.J., Sellati, T.J., and Hazlett, K.R., Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium's surface-carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22335.
149. Twine, S.M., Vinogradov, E., Lindgren, H., Sjostedt, A., and Conlan, J.W., Roles for wbtC, wbtI, and kdtA Genes in Lipopolysaccharide Biosynthesis, Protein Glycosylation, Virulence, and Immunogenicity in *Francisella tularensis* Strain SCHU S4. *Pathogens*, 2012. **1**(1): p. 12-29.
150. Hajjar, A.M., Harvey, M.D., Shaffer, S.A., Goodlett, D.R., Sjostedt, A., Edebro, H., Forsman, M., Bystrom, M., Pelletier, M., Wilson, C.B., Miller, S.I., Skerrett, S.J., and Ernst, R.K., Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. *Infect Immun*, 2006. **74**(12): p. 6730-8.
151. Ancuta, P., Pedron, T., Girard, R., Sandstrom, G., and Chaby, R., Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins. *Infect Immun*, 1996. **64**(6): p. 2041-6.
152. Wang, X., Karbarz, M.J., McGrath, S.C., Cotter, R.J., and Raetz, C.R., MsbA transporter-dependent lipid A 1-dephosphorylation on the periplasmic surface of the inner membrane: topography of *Francisella novicida* LpxE expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 49470-8.
153. Wang, X., McGrath, S.C., Cotter, R.J., and Raetz, C.R., Expression cloning and periplasmic orientation of the *Francisella novicida* lipid A 4'-phosphatase LpxF. *J Biol Chem*, 2006. **281**(14): p. 9321-30.

154. Wang, X., Ribeiro, A.A., Guan, Z., Abraham, S.N., and Raetz, C.R., Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(10): p. 4136-41.
155. Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai, Z., Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(24): p. 7563-8.
156. Gil, H., Benach, J.L., and Thanassi, D.G., Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infect Immun*, 2004. **72**(5): p. 3042-7.
157. Larsson, P., Oyston, P.C., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.H., Garcia, E., Halltorp, G., Johansson, D., Isherwood, K.E., Karp, P.D., Larsson, E., Liu, Y., Michell, S., Prior, J., Prior, R., Malfatti, S., Sjöstedt, A., Svensson, K., Thompson, N., Vergez, L., Wagg, J.K., Wren, B.W., Lindler, L.E., Andersson, S.G., Forsman, M., and Titball, R.W., The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet*, 2005. **37**(2): p. 153-9.
158. Ark, N.M. and Mann, B.J., Impact of *Francisella tularensis* pilin homologs on pilus formation and virulence. *Microb Pathog*, 2011. **51**(3): p. 110-20.
159. Forslund, A.L., Kuoppa, K., Svensson, K., Salomonsson, E., Johansson, A., Bystrom, M., Oyston, P.C., Michell, S.L., Titball, R.W., Noppa, L., Frithz-Lindsten, E., Forsman, M., and Forsberg, A., Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol Microbiol*, 2006. **59**(6): p. 1818-30.
160. Nano, F.E., Zhang, N., Cowley, S.C., Klose, K.E., Cheung, K.K., Roberts, M.J., Ludu, J.S., Letendre, G.W., Meierovics, A.I., Stephens, G., and Elkins, K.L., A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J Bacteriol*, 2004. **186**(19): p. 6430-6.
161. Gray, C.G., Cowley, S.C., Cheung, K.K., and Nano, F.E., The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett*, 2002. **215**(1): p. 53-6.
162. Ludu, J.S., de Bruin, O.M., Duplantis, B.N., Schmerk, C.L., Chou, A.Y., Elkins, K.L., and Nano, F.E., The *Francisella* pathogenicity island protein PdpD is required for full virulence and associates with homologues of the type VI secretion system. *J Bacteriol*, 2008. **190**(13): p. 4584-95.
163. Nano, F.E. and Schmerk, C., The *Francisella* pathogenicity island. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 122-37.
164. Larsson, P., Elfsmark, D., Svensson, K., Wikstrom, P., Forsman, M., Bretin, T., Keim, P., and Johansson, A., Molecular evolutionary consequences of niche restriction in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular pathogen. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(6): p. e1000472.
165. Rydzewski, K., Schulz, T., Brzuszkiewicz, E., Holland, G., Luck, C., Fleischer, J., Grunow, R., and Heuner, K., Genome sequence and phenotypic analysis of a first German *Francisella* sp. isolate (W12-1067) not belonging to the species *Francisella tularensis*. *BMC Microbiol*, 2014. **14**: p. 169.
166. Gu, Q., Li, X., Qu, P., Hou, S., Li, J., Atwill, E.R., and Chen, S., Characterization of *Francisella* species isolated from the cooling water of an air conditioning system. *Braz J Microbiol*, 2015. **46**(3): p. 921-7.
167. Qu, P.H., Chen, S.Y., Scholz, H.C., Busse, H.J., Gu, Q., Kampf, P., Foster, J.T., Glaeser, S.P., Chen, C., and Yang, Z.C., *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2013. **63**(Pt 10): p. 3628-35.
168. Sridhar, S., Sharma, A., Kongshaug, H., Nilsen, F., and Jonassen, I., Whole genome sequencing of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Toba04 gives novel insights into *Francisella* evolution and pathogenicity. *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 598.
169. Clemens, D.L., Ge, P., Lee, B.Y., Horwitz, M.A., and Zhou, Z.H., Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell*, 2015. **160**(5): p. 940-951.
170. Barker, J.R., Chong, A., Wehrly, T.D., Yu, J.J., Rodriguez, S.A., Liu, J., Celli, J., Arulanandam, B.P., and Klose, K.E., The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Mol Microbiol*, 2009. **74**(6): p. 1459-70.
171. Bröms, J.E., Meyer, L., Lavander, M., Larsson, P., and Sjöstedt, A., DotU and VgrG, core components of type VI secretion systems, are essential for *Francisella* LVS pathogenicity. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e34639.
172. de Bruin, O.M., Ludu, J.S., and Nano, F.E., The *Francisella* pathogenicity island protein IglA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC Microbiol*, 2007. **7**: p. 1.
173. Lenco, J., Hubalek, M., Larsson, P., Fucikova, A., Brychta, M., Macela, A., and Stulik, J., Proteomics analysis of the *Francisella tularensis* LVS response to iron restriction: induction of the *F. tularensis* pathogenicity island proteins IglABC. *FEMS Microbiol Lett*, 2007. **269**(1): p. 11-21.
174. Lenco, J., Pavkova, I., Hubalek, M., and Stulik, J., Insights into the oxidative stress response in *Francisella tularensis* LVS and its mutant DeltaiglC1+2 by proteomics analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 2005. **246**(1): p. 47-54.

175. Deng, K., Blick, R.J., Liu, W., and Hansen, E.J., Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect Immun*, 2006. **74**(7): p. 4224-36.
176. Baron, G.S. and Nano, F.E., MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol*, 1998. **29**(1): p. 247-59.
177. Brotcke, A., Weiss, D.S., Kim, C.C., Chain, P., Malfatti, S., Garcia, E., and Monack, D.M., Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect Immun*, 2006. **74**(12): p. 6642-55.
178. Buchan, B.W., McCaffrey, R.L., Lindemann, S.R., Allen, L.A., and Jones, B.D., Identification of migR, a regulatory element of the *Francisella tularensis* live vaccine strain iglABCD virulence operon required for normal replication and trafficking in macrophages. *Infect Immun*, 2009. **77**(6): p. 2517-29.
179. Weiss, D.S., Brotcke, A., Henry, T., Margolis, J.J., Chan, K., and Monack, D.M., In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(14): p. 6037-42.
180. Schmerk, C.L., Duplantis, B.N., Wang, D., Burke, R.D., Chou, A.Y., Elkins, K.L., Ludu, J.S., and Nano, F.E., Characterization of the pathogenicity island protein PdpA and its role in the virulence of *Francisella novicida*. *Microbiology*, 2009. **155**(Pt 5): p. 1489-1497.
181. Bröms, J.E., Meyer, L., Sun, K., Lavander, M., and Sjöstedt, A., Unique substrates secreted by the type VI secretion system of *Francisella tularensis* during intramacrophage infection. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e50473.
182. Eshraghi, A., Kim, J., Walls, A.C., Ledvina, H.E., Miller, C.N., Ramsey, K.M., Whitney, J.C., Radey, M.C., Peterson, S.B., Ruhland, B.R., Tran, B.Q., Goo, Y.A., Goodlett, D.R., Dove, S.L., Celli, J., Veesler, D., and Mougous, J.D., Secreted Effectors Encoded within and outside of the *Francisella* Pathogenicity Island Promote Intramacrophage Growth. *Cell Host Microbe*, 2016. **20**(5): p. 573-583.
183. Rigard, M., Bröms, J.E., Mosnier, A., Hologne, M., Martin, A., Lindgren, L., Punginelli, C., Lays, C., Walker, O., Charbit, A., Telouk, P., Conlan, W., Terradot, L., Sjöstedt, A., and Henry, T., *Francisella tularensis* IglG Belongs to a Novel Family of PAAR-Like T6SS Proteins and Harbors a Unique N-terminal Extension Required for Virulence. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(9): p. e1005821.
184. Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Mekalanos, J.J., Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(5): p. 1528-33.
185. Williams, S.G., Varcoe, L.T., Attridge, S.R., and Manning, P.A., *Vibrio cholerae* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. *Infect Immun*, 1996. **64**(1): p. 283-9.
186. Das, S. and Chaudhuri, K., Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through in silico analysis. *In Silico Biol*, 2003. **3**(3): p. 287-300.
187. Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J., Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol*, 2008. **11**(1): p. 3-8.
188. Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I., Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 2009. **10**: p. 104.
189. Shrivastava, S. and Mande, S.S., Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. *PLoS One*, 2008. **3**(8): p. e2955.
190. Ho, B.T., Dong, T.G., and Mekalanos, J.J., A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe*, 2014. **15**(1): p. 9-21.
191. Journet, L. and Cascales, E., The Type VI Secretion System in *Escherichia coli* and Related Species. *EcoSal Plus*, 2016. **7**(1).
192. Böck, D., Medeiros, J.M., Tsao, H.F., Penz, T., Weiss, G.L., Aistleitner, K., Horn, M., and Pilhofer, M., In situ architecture, function, and evolution of a contractile injection system. *Science*, 2017. **357**(6352): p. 713-717.
193. Kudryashev, M., Wang, R.Y., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., DiMaio, F., Stahlberg, H., Egelman, E.H., and Basler, M., Structure of the type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, 2015. **160**(5): p. 952-962.
194. de Bruin, O.M., Duplantis, B.N., Ludu, J.S., Hare, R.F., Nix, E.B., Schmerk, C.L., Robb, C.S., Boraston, A.B., Hueffer, K., and Nano, F.E., The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IglA, IglB, IglC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology*, 2011. **157**(Pt 12): p. 3483-3491.
195. Brunet, Y.R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., and Cascales, E., The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts

- and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. *PLoS Genet*, 2015. **11**(10): p. e1005545.
196. Zoued, A., Durand, E., Bebeacua, C., Brunet, Y.R., Douzi, B., Cambillau, C., Cascales, E., and Journet, L., TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. *J Biol Chem*, 2013. **288**(38): p. 27031-41.
 197. Broms, J.E., Lavander, M., and Sjostedt, A., A conserved alpha-helix essential for a type VI secretion-like system of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(8): p. 2431-46.
 198. Silverman, J.M., Agnello, D.M., Zheng, H., Andrews, B.T., Li, M., Catalano, C.E., Gonen, T., and Mougous, J.D., Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Mol Cell*, 2013. **51**(5): p. 584-93.
 199. Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J., Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(39): p. 15508-13.
 200. Shneider, M.M., Buth, S.A., Ho, B.T., Basler, M., Mekalanos, J.J., and Leiman, P.G., PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 2013. **500**(7462): p. 350-353.
 201. Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D., Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 343-7.
 202. Russell, A.B., Peterson, S.B., and Mougous, J.D., Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature reviews. Microbiology*, 2014. **12**(2): p. 137-148.
 203. Zoued, A., Cassaro, C.J., Durand, E., Douzi, B., Espana, A.P., Cambillau, C., Journet, L., and Cascales, E., Structure-Function Analysis of the TssL Cytoplasmic Domain Reveals a New Interaction between the Type VI Secretion Baseplate and Membrane Complexes. *J Mol Biol*, 2016. **428**(22): p. 4413-4423.
 204. Zoued, A., Brunet, Y.R., Durand, E., Aschtgen, M.S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C., and Cascales, E., Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(8): p. 1664-73.
 205. Basler, M. and Mekalanos, J.J., Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science (New York, N.Y.)*, 2012. **337**(6096): p. 815-815.
 206. Gil, H., Platz, G.J., Forestal, C.A., Monfett, M., Bakshi, C.S., Sellati, T.J., Furie, M.B., Benach, J.L., and Thanassi, D.G., Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(34): p. 12897-12902.
 207. Chong, A., Child, R., Wehrly, T.D., Rockx-Brouwer, D., Qin, A., Mann, B.J., and Celli, J., Structure-Function Analysis of DipA, a *Francisella tularensis* Virulence Factor Required for Intracellular Replication. *PloS one*, 2013. **8**(6): p. e67965-e67965.
 208. Moule, M.G., Monack, D.M., and Schneider, D.S., Reciprocal analysis of *Francisella novicida* infections of a *Drosophila melanogaster* model reveal host-pathogen conflicts mediated by reactive oxygen and imd-regulated innate immune response. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(8): p. e1001065.
 209. Melillo, A.A., Mahawar, M., Sellati, T.J., Malik, M., Metzger, D.W., Melendez, J.A., and Bakshi, C.S., Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *Journal of bacteriology*, 2009. **191**(20): p. 6447-6456.
 210. Fuller, J.R., Craven, R.R., Hall, J.D., Kijek, T.M., Taft-Benz, S., and Kawula, T.H., RipA, a cytoplasmic membrane protein conserved among *Francisella* species, is required for intracellular survival. *Infection and immunity*, 2008. **76**(11): p. 4934-4943.
 211. Kraemer, P.S., Mitchell, A., Pelletier, M.R., Gallagher, L.A., Wasnick, M., Rohmer, L., Brittnacher, M.J., Manoil, C., Skerett, S.J., and Salama, N.R., Genome-wide screen in *Francisella novicida* for genes required for pulmonary and systemic infection in mice. *Infect Immun*, 2009. **77**(1): p. 232-44.
 212. Akimana, C. and Kwaik, Y.A., *Francisella*-arthropod vector interaction and its role in patho-adaptation to infect mammals. *Front Microbiol*, 2011. **2**: p. 34.
 213. Asare, R., Akimana, C., Jones, S., and Abu Kwaik, Y., Molecular bases of proliferation of *Francisella tularensis* in arthropod vectors. *Environ Microbiol*, 2010. **12**(9): p. 2587-612.
 214. Tlapak, H., Köppen, K., Rydzewski, K., Grunow, R., and Heuner, K., Construction of a New Phage Integration Vector pFIV-Val for Use in Different *Francisella* Species. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018. **8**: p. 75.
 215. Köppen, K., Chen, F., Rydzewski, K., Eienkel, R., Böttcher, T., Morguet, C., Grunow, R., Eisenreich, W., and Heuner, K., Screen for fitness and virulence factors of *Francisella* sp. strain W12-1067 using amoebae. *Int J Med Microbiol*, 2019. **309**(6): p. 151341.

216. Chen, F., Köppen, K., Rydzewski, K., Einenkel, R., Morguet, C., Vu, D.T., Eisenreich, W., and Heuner, K., Myo-inositol as a carbon substrate in *Francisella* and insights into the metabolism of *Francisella* sp. strain W12-1067. *Int J Med Microbiol*, 2020. **in revision**.
217. Appelt, S., Köppen, K., Radonic, A., Drechsel, O., Jacob, D., Grunow, R., and Heuner, K., Genetic Diversity and Spatial Segregation of *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* in Germany. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019. **9**: p. 376.
218. Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983. **166**(4): p. 557-80.
219. Niehaus, I.P., Untersuchungen zum CRISPR Cas 1 System und zum putativen Phagen von *Francisella hispaniensis* in Lebenswissenschaftliche Fakultät. 2014, *Humboldt-Universität zu Berlin*.
220. Rydzewski, K., Tlapak, H., Niehaus, I.P., Dabrowski, P.W., Grunow, R., and Heuner, K., Identification and characterization of episomal forms of integrative genomic islands in the genus *Francisella*. *Int J Med Microbiol*, 2015. **305**(8): p. 874-80.
221. O'Shaughnessy, J.B., Chan, M., Clark, K., and Ivanetich, K.M., Primer design for automated DNA sequencing in a core facility. *Biotechniques*, 2003. **35**(1): p. 112-6, 118-21.
222. Kent, R.J. and Norris, D.E., Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am J Trop Med Hyg*, 2005. **73**(2): p. 336-42.
223. Pawlisz, A.S. and Feng, Y., Three-dimensional regulation of radial glial functions by Lis1-Nde1 and dystrophin glycoprotein complexes. *PLoS Biol*, 2011. **9**(10): p. e1001172.
224. Berg, J., Zscheppang, K., Fatykhova, D., Tonnies, M., Bauer, T.T., Schneider, P., Neudecker, J., Ruckert, J.C., Eggeling, S., Schimek, M., Gruber, A.D., Suttorp, N., Hippenstiel, S., and Hocke, A.C., Tyk2 as a target for immune regulation in human viral/bacterial pneumonia. *Eur Respir J*, 2017. **50**(1).
225. Grunow, R., Splettstoesser, W., McDonald, S., Otterbein, C., O'Brien, T., Morgan, C., Aldrich, J., Hofer, E., Finke, E.J., and Meyer, H., Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000. **7**(1): p. 86-90.
226. Beug, H., von Kirchbach, A., Doderlein, G., Conscience, J.F., and Graf, T., Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*, 1979. **18**(2): p. 375-90.
227. Leutz, A., Beug, H., Walter, C., and Graf, T., Hematopoietic growth factor glycosylation. Multiple forms of chicken myelomonocytic growth factor. *J Biol Chem*, 1988. **263**(8): p. 3905-11.
228. Becker, S., Lochau, P., Jacob, D., Heuner, K., and Grunow, R., Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* ssp. and other highly pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, 2016. **121**: p. 5-7.
229. Petersen, J.M., Carlson, J., Yockey, B., Pillai, S., Kuske, C., Garbalena, G., Pottumarthy, S., and Chalcraft, L., Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples. *Lett Appl Microbiol*, 2009. **48**(6): p. 663-7.
230. Kirchner, S., Kramer, K.M., Schulze, M., Pauly, D., Jacob, D., Gessler, F., Nitsche, A., Dorner, B.G., and Dorner, M.B., Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. *Appl Environ Microbiol*, 2010. **76**(13): p. 4387-95.
231. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
232. Aurass, P., Charakterisierung Patatin-ähnlicher Proteine des Lungenpathogens *Legionella pneumophila*, in Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I. 2009, *Humboldt-Universität zu Berlin*.
233. Aurass, P., Pless, B., Rydzewski, K., Holland, G., Bannert, N., and Flieger, A., *bdhA-patD* operon as a virulence determinant, revealed by a novel large-scale approach for identification of *Legionella pneumophila* mutants defective for amoeba infection. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(13): p. 4506-15.
234. Szymanski, K.V., Toennies, M., Becher, A., Fatykhova, D., N'Guessan, P.D., Gutbier, B., Klauschen, F., Neuschaefer-Rube, F., Schneider, P., Rueckert, J., Neudecker, J., Bauer, T.T., Dalhoff, K., Dromann, D., Gruber, A.D., Kershaw, O., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N., Hippenstiel, S., and Hocke, A.C., *Streptococcus pneumoniae*-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. *Eur Respir J*, 2012. **40**(6): p. 1458-67.
235. Vuorte, J., Jansson, S.E., and Repo, H., Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay. *Cytometry*, 2001. **43**(4): p. 290-6.

236. Eylert, E., Schar, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., and Eisenreich, W., Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol*, 2008. **69**(4): p. 1008-17.
237. Lee, W.N., Byerley, L.O., Bergner, E.A., and Edmond, J., Mass isotopomer analysis: theoretical and practical considerations. *Biol Mass Spectrom*, 1991. **20**(8): p. 451-8.
238. Chen, F., Carbon fluxes and differential glucose usage in franciscella strains, bacillus subtilis and thremogenic brown adipocytes, in Fakultät für Chemie. 2019, *Technische Universität München*.
239. Chen, F., Rydzewski, K., Kutzner, E., Hauslein, I., Schunder, E., Wang, X., Meighen-Berger, K., Grunow, R., Eisenreich, W., and Heuner, K., Differential Substrate Usage and Metabolic Fluxes in *Francisella tularensis* Subspecies holarctica and *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 275.
240. Hall, J.D., Craven, R.R., Fuller, J.R., Pickles, R.J., and Kawula, T.H., *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells in vitro and in vivo following inhalation. *Infect Immun*, 2007. **75**(2): p. 1034-9.
241. Melillo, A., Sledjeski, D.D., Lipski, S., Wooten, R.M., Basrur, V., and Lafontaine, E.R., Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol Lett*, 2006. **263**(1): p. 102-8.
242. Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G., and Forsman, M., Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*, 2003. **69**(1): p. 600-6.
243. El-Etr, S.H., Margolis, J.J., Monack, D., Robison, R.A., Cohen, M., Moore, E., and Rasley, A., *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(23): p. 7488-500.
244. Buse, H.Y., Schaefer, F.W., III, and Rice, E.W., Enhanced survival but not amplification of *Francisella* spp. in the presence of free-living amoebae. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2017. **64**(1): p. 17-36.
245. Santic, M., Ozanic, M., Semic, V., Pavokovic, G., Mrvcic, V., and Kwaik, Y.A., Intra-Vacuolar Proliferation of *F. Novicida* within *H. Vermiformis*. *Front Microbiol*, 2011. **2**: p. 78.
246. Brenz, Y., Winther-Larsen, H.C., and Hagedorn, M., Expanding *Francisella* models: Pairing up the soil amoeba *Dictyostelium* with aquatic *Francisella*. *Int J Med Microbiol*, 2018. **308**(1): p. 32-40.
247. Lampe, E.O., Brenz, Y., Herrmann, L., Repnik, U., Griffiths, G., Zingmark, C., Sjöstedt, A., Winther-Larsen, H.C., and Hagedorn, M., Dissection of *Francisella*-Host Cell Interactions in *Dictyostelium discoideum*. *Appl Environ Microbiol*, 2015. **82**(5): p. 1586-1598.
248. Verhoeven, A.B., Durham-Colleran, M.W., Pierson, T., Boswell, W.T., and Van Hoek, M.L., *Francisella philomiragia* biofilm formation and interaction with the aquatic protist *Acanthamoeba castellanii*. *Biol Bull*, 2010. **219**(2): p. 178-88.
249. Lindgren, M., Bröms, J.E., Meyer, L., Golovliov, I., and Sjöstedt, A., The *Francisella tularensis* LVS DeltapdpC mutant exhibits a unique phenotype during intracellular infection. *BMC Microbiol*, 2013. **13**: p. 20.
250. Law, H.T., Sriram, A., Fevang, C., Nix, E.B., Nano, F.E., and Guttman, J.A., IglC and PdpA are important for promoting *Francisella* invasion and intracellular growth in epithelial cells. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e104881.
251. Bröms, J.E., Lavander, M., Meyer, L., and Sjöstedt, A., IglG and IglI of the *Francisella* pathogenicity island are important virulence determinants of *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun*, 2011. **79**(9): p. 3683-96.
252. Einkenkel, R., Molekularbiologische Untersuchungen von Mutanten einer neuen *Francisella* Spezies (*Francisella* sp. W12-1067), in Lebenswissenschaftliche Fakultät. 2017, *Humboldt-Universität zu Berlin*.
253. Brissac, T., Ziveri, J., Ramond, E., Tros, F., Kock, S., Dupuis, M., Brillet, M., Barel, M., Peyriga, L., Cahoreau, E., and Charbit, A., Gluconeogenesis, an essential metabolic pathway for pathogenic *Francisella*. *Molecular microbiology*, 2015. **98**(3): p. 518-534.
254. Ramond, E., Gesbert, G., Guerrero, I.C., Chhuon, C., Dupuis, M., Rigard, M., Henry, T., Barel, M., and Charbit, A., Importance of host cell arginine uptake in *Francisella* phagosomal escape and ribosomal protein amounts. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2015. **14**(4): p. 870-881.
255. Ziveri, J., Barel, M., and Charbit, A., Importance of Metabolic Adaptations in *Francisella* Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 96.
256. Kroger, C., Stolz, J., and Fuchs, T.M., myo-Inositol transport by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 2010. **156**(Pt 1): p. 128-38.
257. Turner, B.L., Paphazy, M.J., Haygarth, P.M., and McKelvie, I.D., Inositol phosphates in the environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2002. **357**(1420): p. 449-69.
258. Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Kinehara, M., Ikeuchi, M., Ashida, H., and Fujita, Y., myo-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(16): p. 10415-24.

259. Ashwell, G., Wahba, A.J., and Hickman, J., Uronic acid metabolism in bacteria. I. Purification and properties of uronic acid isomerase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1960. **235**: p. 1559-65.
260. Kilgore, W.W. and Starr, M.P., Catabolism of galacturonic and glucuronic acids by *Erwinia carotovora*. *J Biol Chem*, 1959. **234**: p. 2227-35.
261. Peekhaus, N. and Conway, T., What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1998. **180**(14): p. 3495-502.
262. Siddaramappa, S., Challacombe, J.F., Petersen, J.M., Pillai, S., Hogg, G., and Kuske, C.R., Common ancestry and novel genetic traits of *Francisella novicida*-like isolates from North America and Australia as revealed by comparative genomic analyses. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(15): p. 5110-22.
263. Hocke, A.C., Becher, A., Knepper, J., Peter, A., Holland, G., Tonnies, M., Bauer, T.T., Schneider, P., Neudecker, J., Muth, D., Wendtner, C.M., Ruckert, J.C., Drosten, C., Gruber, A.D., Laue, M., Suttorp, N., Hippenstiel, S., and Wolff, T., Emerging human middle East respiratory syndrome coronavirus causes widespread infection and alveolar damage in human lungs. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. **188**(7): p. 882-6.
264. Hocke, A.C., Suttorp, N., and Hippenstiel, S., Human lung ex vivo infection models. *Cell Tissue Res*, 2017. **367**(3): p. 511-524.
265. Jäger, J. and Steinert, M., Enrichment of outer membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila*. *Methods Mol Biol*, 2013. **954**: p. 225-30.
266. Darling, A.C., Mau, B., Blattner, F.R., and Perna, N.T., Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*, 2004. **14**(7): p. 1394-403.
267. Petrosino, J.F., Xiang, Q., Karpathy, S.E., Jiang, H., Yerrapragada, S., Liu, Y., Gioia, J., Hemphill, L., Gonzalez, A., Raghavan, T.M., Uzman, A., Fox, G.E., Highlander, S., Reichard, M., Morton, R.J., Clinkenbeard, K.D., and Weinstock, G.M., Chromosome rearrangement and diversification of *Francisella tularensis* revealed by the type B (OSU18) genome sequence. *J Bacteriol*, 2006. **188**(19): p. 6977-85.
268. Puiu, D. and Salzberg, S.L., Re-assembly of the genome of *Francisella tularensis* subsp. holarctica OSU18. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3427.
269. Svensson, K., Sjodin, A., Bystrom, M., Granberg, M., Brittnacher, M.J., Rohmer, L., Jacobs, M.A., Sims-Day, E.H., Levy, R., Zhou, Y., Hayden, H.S., Lim, R., Chang, J., Guentherer, D., Kang, A., Haugen, E., Gillett, W., Kaul, R., Forsman, M., Larsson, P., and Johansson, A., Genome sequence of *Francisella tularensis* subspecies holarctica strain FSC200, isolated from a child with tularemia. *J Bacteriol*, 2012. **194**(24): p. 6965-6.
270. Haristoy, X., Lozniewski, A., Tram, C., Simeon, D., Bevanger, L., and Lion, C., *Francisella tularensis* bacteremia. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(6): p. 2774-6.
271. Barabote, R.D., Xie, G., Brettin, T.S., Hinrichs, S.H., Fey, P.D., Jay, J.J., Engle, J.L., Godbole, S.D., Noronha, J.M., Scheuermann, R.H., Zhou, L.W., Lion, C., and Dempsey, M.P., Complete genome sequence of *Francisella tularensis* subspecies holarctica FTNF002-00. *PLoS One*, 2009. **4**(9): p. e7041.
272. Burckhardt, F., Hoffmann, D., Jahn, K., Heuner, K., Jacob, D., Vogt, M., Bent, S., Grunow, R., and Zanger, P., Oropharyngeal Tularemia from Freshly Pressed Grape Must. *N Engl J Med*, 2018. **379**(2): p. 197-199.
273. Jarvis, N.A., Donaldson, J.R., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., and Crandall, P.G., *Listeria monocytogenes* infection of HD11, chicken macrophage-like cells. *Poult Sci*, 2017. **96**(4): p. 950-956.
274. Wisner, A.L., Potter, A.A., and Koster, W., Effect of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system on *Salmonella* survival in activated chicken macrophage-like HD11 cells. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e29787.
275. Nix, E.B., Cheung, K.K., Wang, D., Zhang, N., Burke, R.D., and Nano, F.E., Virulence of *Francisella* spp. in chicken embryos. *Infect Immun*, 2006. **74**(8): p. 4809-16.
276. Steinert, M. and Heuner, K., Dictyostelium as host model for pathogenesis. *Cell Microbiol*, 2005. **7**(3): p. 307-14.
277. Ahlund, M.K., Ryden, P., Sjostedt, A., and Stoven, S., Directed screen of *Francisella novicida* virulence determinants using *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun*, 2010. **78**(7): p. 3118-28.
278. Santic, M., Akimana, C., Asare, R., Kouokam, J.C., Atay, S., and Kwai, Y.A., Intracellular fate of *Francisella tularensis* within arthropod-derived cells. *Environ Microbiol*, 2009. **11**(6): p. 1473-81.
279. Vonkavaara, M., Telepnev, M.V., Ryden, P., Sjostedt, A., and Stoven, S., *Drosophila melanogaster* as a model for elucidating the pathogenicity of *Francisella tularensis*. *Cell Microbiol*, 2008. **10**(6): p. 1327-38.
280. Djainal, W.A.S., Shahin, K., Metselaar, M., Adams, A., and Desbois, A.P., Larva of greater wax moth *Galleria mellonella* is a suitable alternative host for the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *BMC Microbiol*, 2020. **20**(1): p. 8.

281. Thelaus, J., Lundmark, E., Lindgren, P., Sjodin, A., and Forsman, M., *Galleria mellonella* Reveals Niche Differences Between Highly Pathogenic and Closely Related Strains of *Francisella* spp. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018. **8**: p. 188.
282. Sjodin, A., Ohrman, C., Backman, S., Larkeryd, A., Granberg, M., Lundmark, E., Karlsson, E., Nilsson, E., Vallesi, A., Tellgren-Roth, C., Stenberg, P., and Thelaus, J., Complete Genome Sequence of *Francisella endociliophora* Strain FSC1006, Isolated from a Laboratory Culture of the Marine Ciliate *Euplotes raikovi*. *Genome Announc*, 2014. **2**(6).
283. Ikeda, T., Yasui, C., Hoshino, K., Arikawa, K., and Nishikawa, Y., Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *salmonella enterica* serovar enteritidis. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(20): p. 6404-9.
284. Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M., Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, 1999. **96**(1): p. 47-56.
285. Sifri, C.D., Begun, J., Ausubel, F.M., and Calderwood, S.B., *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun*, 2003. **71**(4): p. 2208-17.
286. Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M., Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(2): p. 715-20.
287. Van Gerven, N., Derous, V., and Hernalsteens, J.P., Expression of in vivo-inducible *Salmonella enterica* promoters during infection of *Caenorhabditis elegans*. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. **278**(2): p. 236-41.
288. Jayamani, E., Tharmalingam, N., Rajamuthiah, R., Coleman, J.J., Kim, W., Okoli, I., Hernandez, A.M., Lee, K., Nau, G.J., Ausubel, F.M., and Mylonakis, E., Characterization of a *Francisella tularensis*-*Caenorhabditis elegans* Pathosystem for the Evaluation of Therapeutic Compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(9).
289. Frank, D.W. and Zahrt, T.C., Genetics and genetic manipulation in *Francisella tularensis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 67-97.
290. Schunder, E., Rydzewski, K., Grunow, R., and Heuner, K., First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis*. *Int J Med Microbiol*, 2013. **303**(2): p. 51-60.
291. Buchrieser, C. and Charpentier, X., Induction of competence for natural transformation in *Legionella pneumophila* and exploitation for mutant construction. *Methods Mol Biol*, 2013. **954**: p. 183-95.
292. Juan, P.A., Attaiech, L., and Charpentier, X., Natural transformation occurs independently of the essential actin-like MreB cytoskeleton in *Legionella pneumophila*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 16033.
293. Sexton, J.A. and Vogel, J.P., Regulation of hypercompetence in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(12): p. 3814-25.
294. Steinmetz, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Gonzy-Treboul, G., and Gay, P., The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol Gen Genet*, 1985. **200**(2): p. 220-8.
295. Ericsson, M., Golovliov, I., Sandstrom, G., Tarnvik, A., and Sjostedt, A., Characterization of the nucleotide sequence of the *groE* operon encoding heat shock proteins chaperone-60 and -10 of *Francisella tularensis* and determination of the T-cell response to the proteins in individuals vaccinated with *F. tularensis*. *Infect Immun*, 1997. **65**(5): p. 1824-9.
296. Ramsey, K.M., Osborne, M.L., Vvedenskaya, I.O., Su, C., Nickels, B.E., and Dove, S.L., Ubiquitous promoter-localization of essential virulence regulators in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(4): p. e1004793.
297. Golovliov, I., Ericsson, M., Sandstrom, G., Tarnvik, A., and Sjostedt, A., Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect Immun*, 1997. **65**(6): p. 2183-9.
298. Hartley, G., Taylor, R., Prior, J., Newstead, S., Hitchen, P.G., Morris, H.R., Dell, A., and Titball, R.W., Grey variants of the live vaccine strain of *Francisella tularensis* lack lipopolysaccharide O-antigen, show reduced ability to survive in macrophages and do not induce protective immunity in mice. *Vaccine*, 2006. **24**(7): p. 989-96.
299. Cowley, S.C., Myltseva, S.V., and Nano, F.E., Phase variation in *Francisella tularensis* affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol Microbiol*, 1996. **20**(4): p. 867-74.
300. Eigelsbach, H.T., Braun, W., and Herring, R.D., Studies on the variation of *Bacterium tularensis*. *J Bacteriol*, 1951. **61**(5): p. 557-69.
301. Soni, S., Ernst, R.K., Muszynski, A., Mohapatra, N.P., Perry, M.B., Vinogradov, E., Carlson, R.W., and Gunn, J.S., *Francisella tularensis* blue-gray phase variation involves structural modifications of lipopolysaccharide o-antigen, core and lipid A and affects intramacrophage survival and vaccine efficacy. *Front Microbiol*, 2010. **1**: p. 129.

302. Qin, A. and Mann, B.J., Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis* strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol*, 2006. **6**: p. 69.
303. Brzuszkiewicz, E., Schulz, T., Rydzewski, K., Daniel, R., Gillmaier, N., Dittmann, C., Holland, G., Schunder, E., Lautner, M., Eisenreich, W., Luck, C., and Heuner, K., *Legionella oakridgensis* ATCC 33761 genome sequence and phenotypic characterization reveals its replication capacity in amoebae. *Int J Med Microbiol*, 2013. **303**(8): p. 514-28.
304. Avarbock, D., Salem, J., Li, L.S., Wang, Z.M., and Rubin, H., Cloning and characterization of a bifunctional RelA/SpoT homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*, 1999. **233**(1-2): p. 261-9.
305. Dalebroux, Z.D., Edwards, R.L., and Swanson, M.S., SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol Microbiol*, 2009. **71**(3): p. 640-58.
306. Haralalka, S., Nandi, S., and Bhadra, R.K., Mutation in the relA gene of *Vibrio cholerae* affects in vitro and in vivo expression of virulence factors. *J Bacteriol*, 2003. **185**(16): p. 4672-82.
307. Cuthbert, B.J., Ross, W., Rohlfing, A.E., Dove, S.L., Gourse, R.L., Brennan, R.G., and Schumacher, M.A., Dissection of the molecular circuitry controlling virulence in *Francisella tularensis*. *Genes Dev*, 2017. **31**(15): p. 1549-1560.
308. Dean, R.E., Ireland, P.M., Jordan, J.E., Titball, R.W., and Oyston, P.C.F., RelA regulates virulence and intracellular survival of *Francisella novicida*. *Microbiology*, 2009. **155**(Pt 12): p. 4104-4113.
309. Ito, K. and Akiyama, Y., Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol*, 2005. **59**: p. 211-31.
310. Katz, C. and Ron, E.Z., Dual role of FtsH in regulating lipopolysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(21): p. 7117-22.
311. Langklotz, S., Baumann, U., and Narberhaus, F., Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1823**(1): p. 40-8.
312. Lithgow, J.K., Ingham, E., and Foster, S.J., Role of the hprT-ftsH locus in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 2004. **150**(Pt 2): p. 373-381.
313. Liu, Q., Hu, M., Yeo, W.S., He, L., Li, T., Zhu, Y., Meng, H., Wang, Y., Lee, H., Liu, X., Li, M., and Bae, T., Rewiring of the FtsH regulatory network by a single nucleotide change in saeS of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 8456.
314. Margolis, J.J., El-Etr, S., Joubert, L.M., Moore, E., Robison, R., Rasley, A., Spormann, A.M., and Monack, D.M., Contributions of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* chitinases and Sec secretion system to biofilm formation on chitin. *Appl Environ Microbiol*, 2010. **76**(2): p. 596-608.
315. Pitzer, J.E., Zeczycki, T.N., Baumgartner, J.E., Martin, D.W., and Roop, R.M., 2nd, The Manganese-Dependent Pyruvate Kinase PykM Is Required for Wild-Type Glucose Utilization by *Brucella abortus* 2308 and Its Virulence in C57BL/6 Mice. *J Bacteriol*, 2018. **200**(24).
316. Malinverni, J.C. and Silhavy, T.J., An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the gram-negative outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(19): p. 8009-14.
317. Thong, S., Ercan, B., Torta, F., Fong, Z.Y., Wong, H.Y., Wenk, M.R., and Chng, S.S., Defining key roles for auxiliary proteins in an ABC transporter that maintains bacterial outer membrane lipid asymmetry. *Elife*, 2016. **5**.
318. Carpenter, C.D., Cooley, B.J., Needham, B.D., Fisher, C.R., Trent, M.S., Gordon, V., and Payne, S.M., The Vps/VacJ ABC transporter is required for intercellular spread of *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 2014. **82**(2): p. 660-9.
319. Suzuki, T., Murai, T., Fukuda, I., Tobe, T., Yoshikawa, M., and Sasakawa, C., Identification and characterization of a chromosomal virulence gene, vacJ, required for intercellular spreading of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, 1994. **11**(1): p. 31-41.
320. Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., and Riley, L.W., Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science*, 1993. **261**(5127): p. 1454-7.
321. Chitale, S., Ehrt, S., Kawamura, I., Fujimura, T., Shimono, N., Anand, N., Lu, S., Cohen-Gould, L., and Riley, L.W., Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cell Microbiol*, 2001. **3**(4): p. 247-54.
322. Kumar, A., Bose, M., and Brahmachari, V., Analysis of expression profile of mammalian cell entry (mce) operons of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2003. **71**(10): p. 6083-7.
323. Bonofiglio, L., Garcia, E., and Mollerach, M., Biochemical characterization of the pneumococcal glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GalU) essential for capsule biosynthesis. *Curr Microbiol*, 2005. **51**(4): p. 217-21.
324. Mollerach, M., Lopez, R., and Garcia, E., Characterization of the galU gene of *Streptococcus pneumoniae* encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. *J Exp Med*, 1998. **188**(11): p. 2047-56.

325. Jayakar, H.R., Parvathareddy, J., Fitzpatrick, E.A., Bina, X.R., Bina, J.E., Re, F., Emery, F.D., and Miller, M.A., A galU mutant of *Francisella tularensis* is attenuated for virulence in a murine pulmonary model of tularemia. *BMC Microbiol*, 2011. **11**: p. 179.
326. Champion, M.D., Zeng, Q., Nix, E.B., Nano, F.E., Keim, P., Kodira, C.D., Borowsky, M., Young, S., Koehrsen, M., Engels, R., Pearson, M., Howarth, C., Larson, L., White, J., Alvarado, L., Forsman, M., Bearden, S.W., Sjostedt, A., Titball, R., Michell, S.L., Birren, B., and Galagan, J., Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(5): p. e1000459.
327. Fraenkel, D.G., Mutants in glucose metabolism. *Annu Rev Biochem*, 1986. **55**: p. 317-37.
328. Meibom, K.L. and Charbit, A., *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence. *Front Microbiol*, 2010. **1**: p. 140.
329. Gyuranecz, M., Erdelyi, K., Fodor, L., Janosi, K., Szepe, B., Fuleki, M., Szoke, I., Denes, B., and Makrai, L., Characterization of *Francisella tularensis* strains, comparing their carbon source utilization. *Zoonoses Public Health*, 2010. **57**(6): p. 417-22.
330. Bhosale, S.H., Rao, M.B., and Deshpande, V.V., Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev*, 1996. **60**(2): p. 280-300.
331. Berridge, M.J., Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J*, 1984. **220**(2): p. 345-60.
332. Anderson, W.A. and Magasanik, B., The pathway of myo-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. Conversion of 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid to glycolytic intermediates. *J Biol Chem*, 1971. **246**(18): p. 5662-75.
333. Rao, D.E., Rao, K.V., Reddy, T.P., and Reddy, V.D., Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. *Crit Rev Biotechnol*, 2009. **29**(2): p. 182-98.
334. Bolger, C.E., Forestal, C.A., Italo, J.K., Benach, J.L., and Furie, M.B., The live vaccine strain of *Francisella tularensis* replicates in human and murine macrophages but induces only the human cells to secrete proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*, 2005. **77**(6): p. 893-7.
335. Kieffer, T.L., Cowley, S., Nano, F.E., and Elkins, K.L., *Francisella novicida* LPS has greater immunobiological activity in mice than *F. tularensis* LPS, and contributes to *F. novicida* murine pathogenesis. *Microbes Infect*, 2003. **5**(5): p. 397-403.
336. Rick Lyons, C. and Wu, T.H., Animal models of *Francisella tularensis* infection. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1105**: p. 238-65.
337. Fortier, A.H., Slayter, M.V., Ziemba, R., Meltzer, M.S., and Nacy, C.A., Live vaccine strain of *Francisella tularensis*: infection and immunity in mice. *Infect Immun*, 1991. **59**(9): p. 2922-8.
338. Owen, C.R., Buker, E.O., Jellison, W.L., Lackman, D.B., and Bell, J.F., COMPARATIVE STUDIES OF *FRANCISELLA TULARENSIS* AND *FRANCISELLA NOVICIDA*. *J Bacteriol*, 1964. **87**: p. 676-83.
339. Williams, M.C., Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 669-95.
340. Castranova, V., Rabovsky, J., Tucker, J.H., and Miles, P.R., The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1988. **93**(3): p. 472-83.
341. Mason, R.J., Biology of alveolar type II cells. *Respirology*, 2006. **11 Suppl**: p. S12-5.
342. Whitsett, J.A., Wert, S.E., and Weaver, T.E., Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med*, 2010. **61**: p. 105-19.
343. Fahy, J.V. and Dickey, B.F., Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med*, 2010. **363**(23): p. 2233-47.
344. Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B., and Suttorp, N., Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 97.
345. Byrne, A.J., Mathie, S.A., Gregory, L.G., and Lloyd, C.M., Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax*, 2015. **70**(12): p. 1189-96.
346. Chen, K. and Kolls, J.K., T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 605-33.
347. Hoenderdos, K. and Condliffe, A., The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. **48**(5): p. 531-9.
348. Morales-Nebreda, L., Misharin, A.V., Perlman, H., and Budinger, G.R., The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *Eur Respir Rev*, 2015. **24**(137): p. 505-9.
349. Sarva, S.T., Waldo, R.H., Belland, R.J., and Klose, K.E., Comparative Transcriptional Analyses of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0158631.
350. Salomonsson, E., Kuoppa, K., Forslund, A.L., Zingmark, C., Golovliov, I., Sjostedt, A., Noppa, L., and Forsberg, A., Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun*, 2009. **77**(8): p. 3424-31.

351. Nallaparaju, K.C., Yu, J.J., Rodriguez, S.A., Zogaj, X., Manam, S., Guentzel, M.N., Seshu, J., Murthy, A.K., Chambers, J.P., Klose, K.E., and Arulanandam, B.P., Evasion of IFN-gamma signaling by *Francisella novicida* is dependent upon *Francisella* outer membrane protein C. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e18201.
352. Elkins, K.L., Rhinehart-Jones, T.R., Culkin, S.J., Yee, D., and Winegar, R.K., Minimal requirements for murine resistance to infection with *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun*, 1996. **64**(8): p. 3288-93.
353. Leiby, D.A., Fortier, A.H., Crawford, R.M., Schreiber, R.D., and Nacy, C.A., In vivo modulation of the murine immune response to *Francisella tularensis* LVS by administration of anticytokine antibodies. *Infect Immun*, 1992. **60**(1): p. 84-9.
354. Anthony, L.S., Morrissey, P.J., and Nano, F.E., Growth inhibition of *Francisella tularensis* live vaccine strain by IFN-gamma-activated macrophages is mediated by reactive nitrogen intermediates derived from L-arginine metabolism. *J Immunol*, 1992. **148**(6): p. 1829-34.
355. Lindgren, H., Shen, H., Zingmark, C., Golovliov, I., Conlan, W., and Sjostedt, A., Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect Immun*, 2007. **75**(3): p. 1303-9.
356. Chen, W., KuoLee, R., Shen, H., and Conlan, J.W., Susceptibility of immunodeficient mice to aerosol and systemic infection with virulent strains of *Francisella tularensis*. *Microb Pathog*, 2004. **36**(6): p. 311-8.
357. Faron, M., Fletcher, J.R., Rasmussen, J.A., Apicella, M.A., and Jones, B.D., Interactions of *Francisella tularensis* with Alveolar Type II Epithelial Cells and the Murine Respiratory Epithelium. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0127458.
358. Hornick, R.B. and Eigelsbach, H.T., Aerogenic immunization of man with live Tularemia vaccine. *Bacteriol Rev*, 1966. **30**(3): p. 532-8.
359. Scheithauer, L. and Steinert, M., Infection of Human Lung Tissue Explants (HLTEs) with *Legionella pneumophila*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1921**: p. 323-331.
360. Müller, W., Hotzel, H., Otto, P., Karger, A., Bettin, B., Bocklisch, H., Braune, S., Eskens, U., Hörmansdorfer, S., Konrad, R., Nessler, A., Peters, M., Runge, M., Schmooch, G., Schwarz, B.A., Sting, R., Myrtennas, K., Karlsson, E., Forsman, M., and Tomaso, H., German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol*, 2013. **13**: p. 61.
361. Wittwer, M., Altpeter, E., Pilo, P., Gygli, S.M., Beuret, C., Foucault, F., Ackermann-Gaumann, R., Karrer, U., Jacob, D., Grunow, R., and Schurch, N., Population Genomics of *Francisella tularensis* subsp. holarctica and its Implication on the Eco-Epidemiology of Tularemia in Switzerland. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018. **8**: p. 89.
362. Boone, I., Hassler, D., Nguyen, T., Splettstoesser, W.D., Wagner-Wiening, C., and Pfaff, G., Tularemia in southwest Germany: Three cases of tick-borne transmission. *Ticks Tick Borne Dis*, 2015. **6**(5): p. 611-4.
363. Borde, J.P., Zange, S., Antwerpen, M.H., Georgi, E., von Buttlar, H., Kern, W.V., and Rieg, S., Five cases of vector-borne *Francisella tularensis* holarctica infections in south-western Germany and genetic diversity. *Ticks Tick Borne Dis*, 2017. **8**(5): p. 808-812.
364. Koene, M., Rijks, J., Maas, M., Ruuls, R., Engelsma, M., van Tulden, P., Kik, M., J, I.J., Notermans, D., de Vries, M., Fanoy, E., Pijnacker, R., Spierenburg, M., Bavelaar, H., Berkhout, H., Sankatsing, S., Diepersloot, R., Myrtennas, K., Granberg, M., Forsman, M., Roest, H.J., and Grone, A., Phylogeographic Distribution of Human and Hare *Francisella Tularensis* Subsp. Holarctica Strains in the Netherlands and Its Pathology in European Brown Hares (*Lepus Europaeus*). *Front Cell Infect Microbiol*, 2019. **9**: p. 11.
365. Lee, S.D., Lee, Y.S., and Lee, J.B., Polymorphism in the mitochondrial cytochrome B gene in Koreans. An additional marker for individual identification. *Int J Legal Med*, 2002. **116**(2): p. 74-8.
366. Ngo, K.A. and Kramer, L.D., Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. *J Med Entomol*, 2003. **40**(2): p. 215-22.
367. Irwin, D.M., Kocher, T.D., and Wilson, A.C., Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol*, 1991. **32**(2): p. 128-44.
368. Schlitter, D., van der Straeten, E., Amori, G., Hutterer, R., K., B., Y., N. & Mitsain, and Galagan, J. *Apodemus sylvaticus*, Long-tailed Field Mouse. 2016 [cited 2020 23.02.2020]; Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T1904A22423831.en>.
369. Tadin, A., Tokarz, R., Markotic, A., Margaletic, J., Turk, N., Habus, J., Svoboda, P., Vucelja, M., Desai, A., Jain, K., and Lipkin, W.I., Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. *Am J Trop Med Hyg*, 2016. **94**(2): p. 466-73.
370. Kaysser, P., Seibold, E., Matz-Rensing, K., Pfeffer, M., Essbauer, S., and Splettstoesser, W.D., Re-emergence of tularemia in Germany: presence of *Francisella tularensis* in different rodent species in endemic areas. *BMC Infect Dis*, 2008. **8**: p. 157.

- 371. Christova, I., Velinov, T., Kantardjiev, T., and Galev, A., Tularaemia outbreak in Bulgaria. *Scand J Infect Dis*, 2004. **36**(11-12): p. 785-9.
- 372. Forsman, M., Henningson, E.W., Larsson, E., Johansson, T., and Sandstrom, G., *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000. **31**(3): p. 217-224.
- 373. Desvars, A., Furberg, M., Hjertqvist, M., Vidman, L., Sjostedt, A., Ryden, P., and Johansson, A., Epidemiology and ecology of tularemia in Sweden, 1984-2012. *Emerg Infect Dis*, 2015. **21**(1): p. 32-9.
- 374. Schlessner, J.E. and Parisi, B., Inactivation of *Yersinia pseudotuberculosis* 197 and *Francisella tularensis* LVS in beverages by high pressure processing. *J Food Prot*, 2009. **72**(1): p. 165-8.
- 375. Day, J.B., Trujillo, S., Hao, Y.Y., and Whiting, R.C., Thermal resistance of *Francisella tularensis* in infant formula and fruit juices. *J Food Prot*, 2008. **71**(11): p. 2208-12.

Publikationen

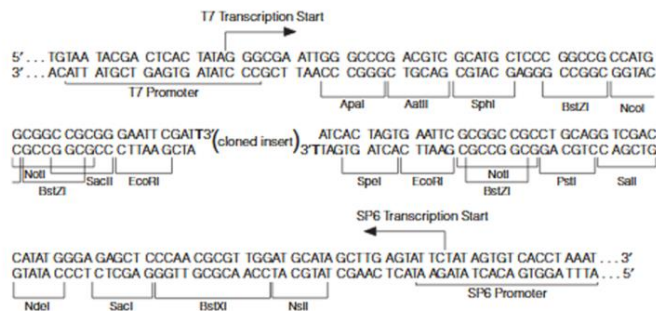
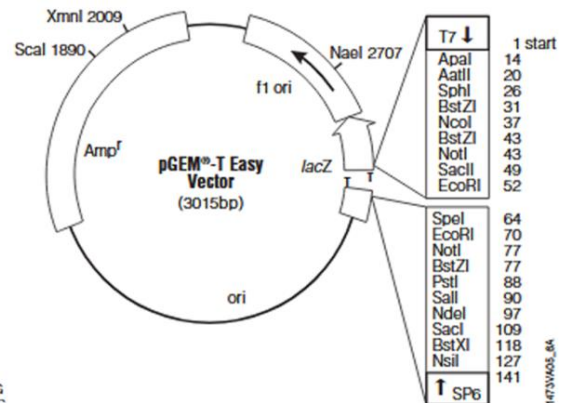
- (86) Jacob, D., **Köppen, K.**, Radonic, A., Haldemann, B., Zanger, P., Heuner, K., and Grunow, R., Molecular identification of the source of an uncommon tularaemia outbreak, Germany, autumn 2016. *Euro Surveill*, 2019. **24**(18).
- (215) Tlapak, H., **Köppen, K.**, Rydzewski, K., Grunow, R., and Heuner, K., Construction of a New Phage Integration Vector pFIV-Val for Use in Different *Francisella* Species. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018. **8**: p. 75.
- (216) **Köppen, K.**, Chen, F., Rydzewski, K., Eienkel, R., Böttcher, T., Morguet, C., Grunow, R., Eisenreich, W., and Heuner, K., Screen for fitness and virulence factors of *Francisella* sp. strain W12-1067 using amoebae. *Int J Med Microbiol*, 2019. **309**(6): p. 151341.
- (217) Chen, F., **Köppen, K.**, Rydzewski, K., Eienkel, R., Morguet, C., Vu, D.T., Eisenreich, W., and Heuner, K., Myo-inositol as a carbon substrate in *Francisella* and insights into the metabolism of *Francisella* sp. strain W12-1067. *Int J Med Microbiol*, 2020. **in revision**.
- (218) Appelt, S., **Köppen, K.**, Radonic, A., Drechsel, O., Jacob, D., Grunow, R., and Heuner, K., Genetic Diversity and Spatial Segregation of *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* in Germany. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019. **9**: p. 376.

Anhang

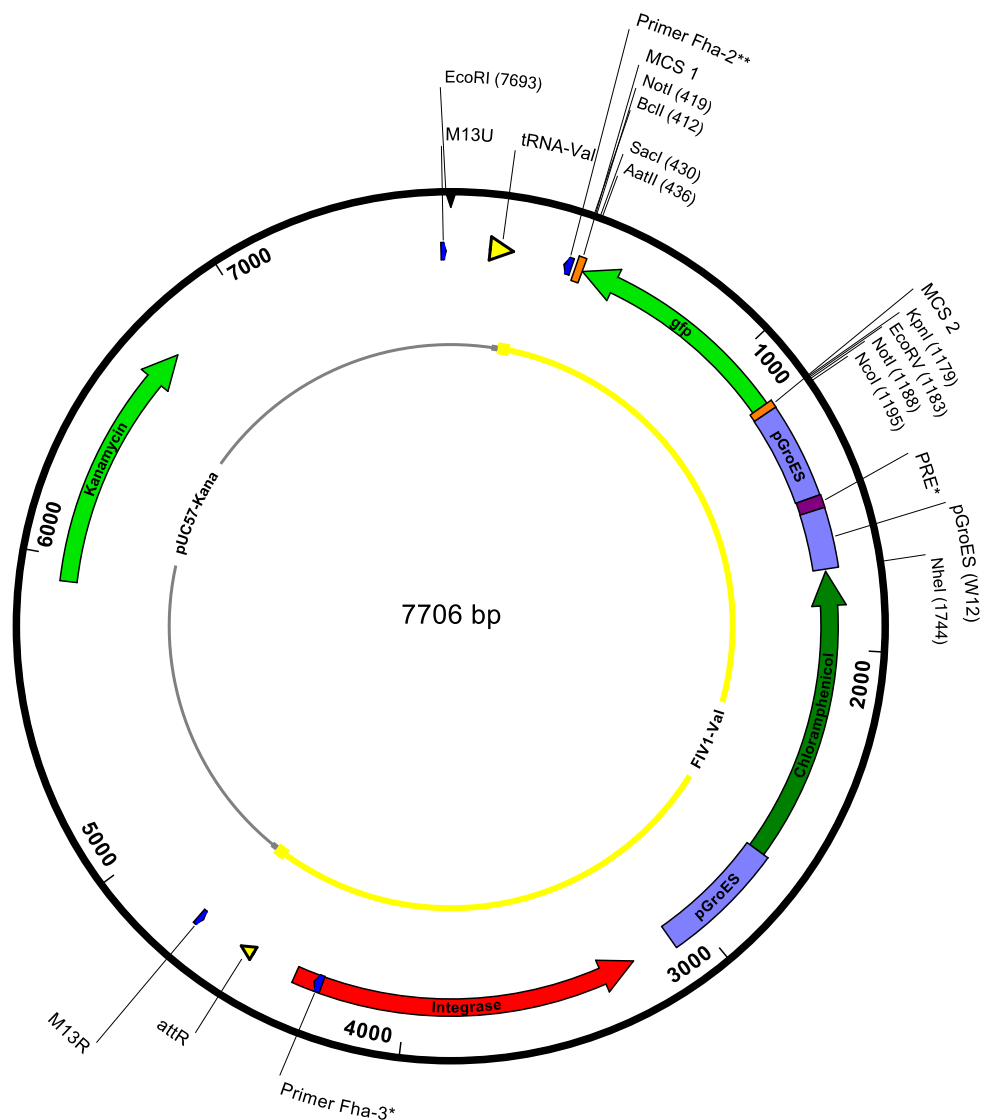
Vektorkarte des pGEM-T Easy Vektors (Promega)

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3



Vektorkarte des pFIV1-Val Vektors [214]



Primer	Primersequenz (5'-3')	Primerposition
M13 U	gtaaaacgacgccagt	7675-7691
M13 R	ggaaacagctatgacatg	4731-4713
Fha 2**	attagcaatgagtagcttggtgct	398-373
Fha 3*	ctgagaattaagccacttatatcagaat	4277-4304

Enzyme, die nicht schneiden:

AarI, AfeI, AhdI, AscI, AvrII, BaeI, BaeI, BbvCI, BcgI, BcgI, BglII, BmgBI, BpII, BseRI, BsgI, BsiWI, BspMI, BssHII, BstEII, BstXI, Bsu36I, FseI, FspAI, MluI, PmeI, PpuMI, PshAI, PstI, PstI, RsrII, SmaI, SexAI, SfiI, SgrAI, SrfI, XcmI, XhoI

Sequenzvergleich verschiedener IgIC Proteine (*F. philomiragia* DR78_315; *Fth* LVS FTL_0113; *Fno* U112 FTN_1322; *V. cholerae* Hcp-1) und IgIC-ähnlicher Proteine (*Fno* FTN_0044; *A. guangzhouensis* SD28_01195; F-W12, OrfE und Orf204). Erstellt mit Geneious Prime.

DR78_315	--MSEMITRQQVTSGETIHVRTDPTACIGSHPNRRLFIDS---VTIAGENLDKN---IVA	52
FTL_0113	--MSEMITRQQVTSGETIHVRTDPTACIGSHPNCRRLFIDS---LTIAGEKLDKN---IVA	52
FTN_1322	--MSEMITRQQVTSGETIHVRTDPTACIGSHPNCRRLFIDS---LTIAGEKLDKN---IVA	52
Orf204	-----MKPTECV-KYDRSGLDINSYFGCAESEMFINKNESPLLLI	38
FTN_0044	--MSNFIA----IDGQKM--VLTPN----SHPNANLSAPS---PTHDSVFVQLK---LSV	42
OrfE	--MSDFIA----IDGQKM--VLTPN----SHPSANLTSPS---PTHDAVFLELK---FSA	42
SD28_01195	--MSDFIA----IDGQKM--VLTPN----SHPSANLTSPS---PTHDAVFLELK---FSA	42
Hcp-1	MPTPCYIS----IEGQTQ--GLITA----GACTADSIGDSFVEGHEDEMLVQQF---DHV	47
DR78_315	IEGGEDVTKA-----DSATAAASVIRLSITPGSINP-TISIT-LGALIKSSVRTKLE--	102
FTL_0113	IEGGEDVTKA-----DSATAAASVIRLSITPGSINP-TISIT-LGVLIKSNVRTKIE--	102
FTN_1322	IEGGEDVTKA-----DSATAAASVIRLSITPGSINP-TISIT-LGVLIKSNVRTKIE--	102
Orf204	EKGGLEVKSG---SLKVTIEDIAGIYNREKDDGSTKAIAGAILGLRARNPGEVYDLNIC	95
FTN_0044	EAGPVDLKCTLPPYYDLGTQSPGSAAVNFKVEHAHFDIAQTIT-LHLRTNKTIAAEIN--	99
OrfE	EAGPADLKTKIPYYDVGTTPSGSAAVNFKLEHGDFDAVNQTIV-LHLRTTKTIVSELN--	99
SD28_01195	EAGPADLKSKIIPYYDVGTTPSGSAAVNFKLEHGDFDAVNQTVV-LHLRTTKTIISELN--	99
Hcp-1	VTVPDTPQSGQPSGQRVHKPFKFTVALNKAVPLLYNALSSGEK-LKTVELKWYRTSIE--	104
DR78_315	----EK-----VSSILQASA-TDMKIKLGNSNKKQ---EYKTDEAWGIMIDLSNLELYPI	149
FTL_0113	----EK-----VSSILQASA-TDMKIKLGNSNKKQ---EYKTDEAWGIMIDLSNLELYPI	149
FTN_1322	----EK-----VSSILQASA-TDMKIKLGNSNKKQ---EYKTDEAWGIMIDLSNLELYPI	149
Orf204	LSSKTK-----IEKKQGSSDSLITITIKSGKLNKEQITLENNNGTVWASVFDVKT-----	145
FTN_0044	----TA-----LTKVLNSGAKAQLSVEIAAANDKQTVQANKGTIVQYFDPQSAK-----	145
OrfE	----KA-----ITKLLSSGAKAQLSVEIASANDKQTVQANKGTIVKYFDPQGAKE-----	145
SD28_01195	----KA-----ITKLLSSGAKAQLSVEIASANDKQTVQANKGTIVKYFDPQGAKE-----	145
Hcp-1	----GKQENFFTTKLENASI-VDIHCEMPHCQD-----PAKSDFTQNVTVLSYSR-----	149
DR78_315	SAKAFSISIEPT---ELMGVSKDGMRYHI-----ITIDGLTTSQGSLPVCGAA	194
FTL_0113	SAKAFSISIEPT---ELMGVSKDGMRYHI-----ISIDGLTTSQGSLPVCCAA	194
FTN_1322	SAKAFSISIEPT---ELMGVSKDGMRYHI-----ISIDGLTTSQGSLPVCCAA	194
Orf204	----FEIIVSAD-DYYVESASHPGLQILR-----INYGRIKG--VTQLSIPATN-E	188
FTN_0044	----FTMCEEKTRQFQSVIAHECGDSYLRTPAQNETELTGIIIVVTG--KWEKGTPISTWT	199
OrfE	----FTLCEEKTRQFQHLLAHECGDLYRSATNNETELTGIIISG--KWEKGTPISTWT	199
SD28_01195	----FTMCEEKTRQFQHLLAHECGDLYRSATNNETELTGIIISG--KWEKGTPISTWT	199
Hcp-1	-----KIT--WDHVNAGTSGSD-----DWRKPIEA--	174
DR78_315	STDKGVAKIGYIAAA-	209
FTL_0113	STDKGVAKIGYIAAA-	209
FTN_1322	STDKGVAKIGYIAAA-	209
Orf204	ENSVQVIEMGDPTVSR	204
FTN_0044	GDSTQKIVVGVDAGGK	215
OrfE	SDSSQKIVVGVDGSGK-	214
SD28_01195	SDSTQKIVVGVDGSGK-	214
Hcp-1	-----	172

Sequenzabgleich verschiedener VgrG Proteine (*F. philomiragia* DR78_307; *Fth* LVS FTL_0123; *Fno* U112 FTN_1312; *V. cholerae* VgrG-1) und VgrG-ähnlicher Proteine (*Fno* FTN_0038; *A. guangzhouensis* SD28_01165; F-W12, OrfD1 und OrfD2). Erstellt mit Geneious Prime.

DR78_307	-----	
FTL_0123	-----	
FTN_1312	-----	
FTN_0038	-----	
OrfD1	-----	
SD28_01165	-----	
OrfD2	-----	
VgrG-1	MATLAYSIEVEGLEDETLVVRGFHHGQESLSNSVFLGQACYGFRYEVLASRVSNLTAEQM	60
DR78_307	-----	
FTL_0123	-----	
FTN_1312	-----	
FTN_0038	-----	
OrfD1	-----	
SD28_01165	-----	
OrfD2	-----	
VgrG-1	VDKRAELKLYRNSQLVQRVHGIVRAFSQGDIGHHTFYQLTLVPALERLSLRHNSRIFQK	120
DR78_307	-----	
FTL_0123	-----	
FTN_1312	-----	
FTN_0038	-----	
OrfD1	-----	
SD28_01165	-----	
OrfD2	-----	
VgrG-1	QTVPEILSILLQEMGINDYAFALKRDGVQREFCVQYRESIDIFLHRLAAEEGLVYSFVHE	180
DR78_307	-----MSK-----	3
FTL_0123	-----MSK-----	3
FTN_1312	-----MSK-----	3
FTN_0038	-----MSEK-----DT-----	6
OrfD1	-----MADN-----	4
SD28_01165	-----MAD-----	3
OrfD2	-----MSDT-----	4
VgrG-1	AGKHTLYFSDASDSLKLEPIPYNALVGGAIDTPYIHGLTYRTQAEVSEVQLKDYSFKK	240
DR78_307	-----	3
FTL_0123	-----	3
FTN_1312	-----	3
FTN_0038	-----	6
OrfD1	-----	4
SD28_01165	-----	3
OrfD2	-----	4
VgrG-1	PAYSFLQTVQGTELDYQQTRYQHFDAPGRYKDDVNGAAFSQIRLDYLRRHAHTATGQSNE	300
DR78_307	-----	3
FTL_0123	-----	3
FTN_1312	-----	3
FTN_0038	-----	6
OrfD1	-----	4
SD28_01165	-----	3
OrfD2	-----	4
VgrG-1	PLLRAGYKFDLQEHLDPAMNRDWWVVSINHQGEQPQALQEDGGSGATTYSNQFSLIPGHL	360
DR78_307	-----	3
FTL_0123	-----	3
FTN_1312	-----	3
FTN_0038	-----	6
OrfD1	-----	4
SD28_01165	-----	3
OrfD2	-----	4
VgrG-1	HWRAEPQPKPQVDGPMIATVVGPEGEEIFCDEHGRVKIHFPWDYRYSNGNEQSSCWVRVSQ	420
DR78_307	-----	3
FTL_0123	-----	3

FTN_1312	-----	3
FTN_0038	-----	6
OrfD1	-----	4
SD28_01165	-----	3
OrfD2	-----	4
VgrG-1	GWAGSQYGFIAIPRIGHEVIVEFLNGDPDQPIITGRTYHATNTPPYTLPEHKTKTVLRTE	480
DR78_307	-----ADHIFNLEEQGLLIDIKD	21
FTL_0123	-----ADHIFNLEEQGLLIDIKD	21
FTN_1312	-----ADHIFNLEEQGLLIDIKD	21
FTN_0038	-----NNNYLEITS DYITLDA--	22
OrfD1	-----NNNFFEITSDDITINA--	20
SD28_01165	-----NNNFFEITSDDIILNA--	19
OrfD2	-----FNHTIDADKDKIEISG--	20
VgrG-1	THQGEFNELSFEDQAGKEQIYLHAQKDFDGLIENDHTTVIRHDHHLTVENDQFTQIK--	538
DR78_307	ESKGCTTKLESSGKISHNATDSIEST-----AEKQITESVKDSKISITEK--EILLA	71
FTL_0123	DSKGCTTKLESSGKITHNATESIESS-----ADKQIENVKDSKISITEK--EILLA	71
FTN_1312	DSKGCTTKLESSGKITHNATESIESS-----ADKQIENVKDSKISITEK--EILLA	71
FTN_0038	-----NNKSILILNQ-----TEEYVNIKT KEMTIECNDK---ITLK	55
OrfD1	-----NQKTILTLSQ-----KDESAKLTAKETTIECKDK---IILK	53
SD28_01165	-----NQKSILILSQ-----KDESAKLTAKETTIECKDK---ITLK	52
OrfD2	EAHSHTQKITLD---FKSKKLTLENKELKVCIDSEEEYITLHNGESSIKI-EK---NKIT	73
VgrG-1	HNQHLTVEWESREAVTGEQVLSIEGS-----LHVKTGKVWVNEAGTEIHVK	584
DR78_307	TKKSSIMLNDISKIVIKIGNSTIVLDDSSISIESATINVKSTAN-----	114
FTL_0123	TKKSSIMLSEDKIVIKIGNSLIILDDSNISLESATINIKSSAN-----	114
FTN_1312	TKKSSIMLSEDKIVIKIGNSLIILDDSNISLESATINIKSSAN-----	114
FTN_0038	CGNNTIELSSNSITLKC GSSSIELSSSEINLKSL SINLG-----	115
OrfD1	CGSNSIEINSSTV I I KCGESSVELSSSGVSIKGT SINLD-----	113
SD28_01165	CGSNSIEINSSTV I I KCGASSIELSSSGVTIKGT SINLG-----	112
OrfD2	CKAPTFEIDCDSFAINSKET EIKASKS-VDIKSPKVNTG-----	132
VgrG-1	AGQKVVI EAGSEITVKAGGSFVKVDPAGVHLSGALVNLNSGGSAGSGSGFGGAMPALPGG	644
DR78_307	----TNIQASQNIGVKGLNTSIKADV-----	136
FTL_0123	----INIQASQNIDIKSLNNSIKADV-----	136
FTN_1312	----INIQASQNIDIKSLNNSIKADV-----	136
FTN_0038	-----	175
OrfD1	-----	173
SD28_01165	-----	172
OrfD2	-----	192
VgrG-1	LEPAVALAPPQTISYQALLQAEQANVPAVKVCPLAAQEATPAVNSITPPPPPIAPPMAP	704
DR78_307	-----SLNAE-----GVNVNIKG-----	149
FTL_0123	-----NLNAE-----GLDVNIKG-----	149
FTN_1312	-----NLNAE-----GLDVNIKG-----	149
FTN_0038	-----	235
OrfD1	-----	233
SD28_01165	-----	232
OrfD2	-----	252
VgrG-1	PQPIMNPQPTANAQPNLGRSTKATPDFPTHFPKSSIGIENELAGLVVAMPANSAQKFGYV	764
DR78_307	-----	149
FTL_0123	-----	149
FTN_1312	-----	149
FTN_0038	-----	295
OrfD1	-----	293
SD28_01165	-----	292
OrfD2	-----	312
VgrG-1	KSAQGDALFMLTKDMNQGSYQRPPSLQDGKNYQNWQTHTVELVSYPCEMDDKAAVETRKQ	824
DR78_307	-----SATASIKGSAATM-	162
FTL_0123	-----SVTASIKGSTATM-	162
FTN_1312	-----SVTASIKGSAATM-	162
FTN_0038	-----	355
OrfD1	-----	353
SD28_01165	-----	352
OrfD2	-----	372
VgrG-1	AMLWLATHFTTHIDQSNHQPLAPIQSEDGRFVIEITNAKHVIAAGNGISAESQGQTITMT	884

DR78_307	-----	162
FTL_0123	-----	162
FTN_1312	-----	162
FTN_0038	-----	415
OrfD1	-----	413
SD28_01165	-----	412
OrfD2	-----	432
VgrG-1	PSGQQATVGVAAKGFGTSATPELRLLESAPWYQKSLKSQFASL TSAENLDDKELAA NVFA	944
DR78_307	-----	162
FTL_0123	-----	162
FTN_1312	-----	162
FTN_0038	-----	475
OrfD1	-----	473
SD28_01165	-----	472
OrfD2	-----	492
VgrG-1	YLTSIY LKTAELAKKFGIY INEWDPMSEQITPNANGLTDPKVKN AWEILPRTKPSKIVEI	1004
DR78_307	-----	162
FTL_0123	-----	162
FTN_1312	-----	162
FTN_0038	-----	535
OrfD1	-----	533
SD28_01165	-----	532
OrfD2	-----	552
VgrG-1	LSKSDAKAVMKHIKPQLQSRYSLSKNVQYFQDGGEVAGHG INNATVGD KHSPELAIL	1064
DR78_307	-----	162
FTL_0123	-----	162
FTN_1312	-----	162
FTN_0038	-----	595
OrfD1	-----	593
SD28_01165	-----	592
OrfD2	-----	612
VgrG-1	FEFRTVPNELQSYLPKTESTTKSEVKLLDQFDPMKRKTVIQQVESLVQNSGDAFDK WYQS	1124
DR78_307	-----VG	164
FTL_0123	-----VG	164
FTN_1312	-----VG	164
FTN_0038	-----	94
OrfD1	-----	92
SD28_01165	-----	91
OrfD2	-----	111
VgrG-1	YRDSMNQPPVKNAKKIASANQKAQWVKEHNPQEWQRIIA	1163

Sequenzvergleich verschiedener *glk* Gene (*Fth* LVS *FTL_0404*; *Fno* U112 *FTN_0462*; *Ftt* *FTT_1295c*; *F-W12* *peg.721*; *A. guangzhouensis* *SD28_07956*). Erstellt mit Geneious Prime.

FTL_0404 glk1	ATGTATATATTATCAGGAGATATTGGTGGCACTAACACTAGATTAGAGGTTTCTCTTTTA	60
FTT_1295c glk1	ATGTATATATTATCAGGAGATATTGGTGGCACTAACACTAGATTAGAGGTTTCTCTTTTA	60
FTN_0462 glk	ATGTATATATTATCAGGAGATATTGGTGGCACTAACACTAGATTAGAGGTTTCTCTTTTA	60
peg.721 glk	ATGTATATATTATCTGGAGATATAGGAGGAACTAATACTAGATTAGAAGTTTCTCAGTTG	60
SD28_07565	ATGTATATATTATCTGGAGATATCGGAGGAACTAATACTAGATTAGAAGTTTCTCAGTTG	60
FTL_0404 glk1	GAGAAATGGTGCGACACAAAGTATAGCTATAAGAAAAGTATAAAGGTGCGAATTTCAATTGT	120
FTT_1295c glk1	GAGAAATGGTGCGACACAAAGTATAGCTATAAGAAAAGTATAAAGGTGCGAATTTCAATTGT	120
FTN_0462 glk	GAGAAATGGTGCGACACAAAGTATAGCTATAAGAAAAGTATAAAGGTGCGAATTTCAATTGT	120
peg.721 glk	GAAAGTGGTAAACTCAAAGTATAGCTGTAAGAAAATACAAAGGAGCAGATTTTAATTGT	120
SD28_07565	GAAATGGTAAACTCAAAGTATAGCTATAAGAAAATACAAAGGAGCGGATTTTAATTGC	120
FTL_0404 glk1	TTATCTGATATCATTGATAAGTTTTTATCTGAGGTGGACTTAGTAGGTCAAATAGATTCT	180
FTT_1295c glk1	TTATCTGATATATTGATAAGTTTTTATCTGAGGTGGACTTAGTAGGTCAAATAGATTCT	180
FTN_0462 glk	TTATCTGATATCATTGATAAGTTTTTATCTGAGGTGGACTTAGTAGGTCAAATAGATTCT	180
peg.721 glk	CTATCTGATGTTATTGATATTTTTTATCTGCAATTGATTTGGCTGGAAAAATTGATTCA	180
SD28_07565	CTATCTGATGTTATTGATATTTTCTTAGCTGAAATTAATTTAGCTGGACAGATTGATTCA	180

FTL_0404 glk1	GTTTGTCTTGCAGTAGCTGGATTTGTCTCTAATGGTGAAGTTGAAGTGACTAATCTGCCA	240
FTT_1295c glk1	GTTTGTCTTGCAGTAGCTGGATTTGTCTCTAATGGTGAAGTTGAAGTGACTAATCTGCCA	240
FTN_0462 glk	GTTTGTCTCGCAGTAGCTGGATTTGTCTCTAATGGTGAAGTTGAAGTAACTAATCTGCCA	240
peg.721 glk	GTCTGCTTAGCTGTTGCTGGTTTTGTGGTAGATGGAGAGGTGCGAAATTACAAATTTGCCA	240
SD28_07565	GTTTGTCTTAGCTGTTGCTGGTTTTGTGGTAGACGGAGAGGTTGAAATTACAAATTTGCCA	240
FTL_0404 glk1	TGGATGGTTTTCTGAGCAATATATCTCAGAAGGACTTGGTATAGACAAAACCTAAGGTTAAA	300
FTT_1295c glk1	TGGATGGTTTTCTGAGCAATATATCTCAGAAGGACTTGGTATAGACAAAACCTAAGGTTAAA	300
FTN_0462 glk	TGGATGGTTTTCTGAGCAATATATCTCAGAAGGACTTGGTATAGACAAAACCTAAGGTTAAA	300
peg.721 glk	TGGATGGTTTTCTGAGCAATACGTTGCTGAGGGTTTAGGTATTGATAAAAGTAAAGTCAAA	300
SD28_07565	TGGATGGTTTTCTGAGCAGTATGTTGCTGAGGGTTTAGGTATTGACAAAATAAAGTAAA	300
FTL_0404 glk1	GTGATTAATGACTTTGAAGCAATTGGTTATGGTATAGAATCTCTAGATAGAGAAAAAGAT	360
FTT_1295c glk1	GTGATTAATGACTTTGAAGCAATTGGTTATGGTATAGAATCTCTAGATAGAGAAAAAGAT	360
FTN_0462 glk	GTGATTAATGACTTTGAAGCAATTGGTTATGGTATAGAATCTCTAGATAGAGAAAAAGAT	360
peg.721 glk	GTGATAAATGATTTTGAAGCCATTGGCTATGGTATTGAAAGATTAGACCGACAAAAGGAT	360
SD28_07565	GTGATAAATGATTTTGAAGCCATTGGCTATGGTATTGAAATAATTAGATCGACAAAAGGAT	360
FTL_0404 glk1	ATAATCACAATCCAAGAAGGTAAAAAAGATGATGATAAATTATGTGCTGTAGTTGGTGCT	420
FTT_1295c glk1	ATAATCACAATCCAAGAAGGTAAAAAAGATGATGATAAATTATGTGCTGTAGTTGGTGCT	420
FTN_0462 glk	ATAATCACAATCCAAGAAGGTAAAAAAGATGATGATAAATTATGTGCTGTAGTTGGTGCT	420
peg.721 glk	ATTATCACTGTTCAAGAAGGTAAAAAAGATGATAATAGCCTTTGTGCAGTTATTGGTGCA	420
SD28_07565	ATTATAACTATTCAAGAAGGCAAAAAAGATGATAATAGTCTTTGTGTAGTTATTGGTGCA	420
FTL_0404 glk1	GGTACAGGTTTGGGAATGTGTTTAGTTAGCTATGATAAAGACGATAAGCCAAGAGTTTAT	480
FTT_1295c glk1	GGTACAGGTTTGGGAATGTGTTTAGTTAGCTATGATAAAGACGATAAGCCAAGAGTTTAT	480
FTN_0462 glk	GGTACAGGTTTGGGAATGTGTTTAGTTAGCTATGATAAAGACGATAAGCCAAGAGTTTAT	480
peg.721 glk	GGAAGTGGGCTTGGGAATGTGTTTGGTGAGTTATGATGAAAACCATAGCCTAGAGTTTAC	480
SD28_07565	GGAAGTGGGCTTGGGAATGTGTTTGGTGAGTTATGATGAAAACCATAGCCTAGAGTTTAC	480
FTL_0404 glk1	AAAACAGAAGGAGGTCATGTGGATTCTCACCTGTTGATGACGAACAAGTTGAGTTATTT	540
FTT_1295c glk1	AAAACAGAAGGAGGTCATGTGGATTCTCACCTGTTGATGATGAACAAGTTGAGTTATTT	540
FTN_0462 glk	AAAACAGAAGGAGGTCATGTGGATTCTCACCTGTTGATGATGAACAAGTTGAGTTATTT	540
peg.721 glk	AAAAGTGAAGGAGGTCATGTTGATTTCCTCCAGTTGATGATGAGCAGGTTGAATTATTT	540
SD28_07565	AAAACGAAGGAGGTCATGTTGATTCTCTCCTGTTGGTGATGAGCAGGTTGAGCTATTT	540
FTL_0404 glk1	AAGTTTATGCGTAAGACTTTCCATCGTATCTCTCCTGAGAGATTCTGTAGCGGCTACGGC	600
FTT_1295c glk1	AAGTTTATGCGTAAGACTTTCCATCGTATCTCTCCTGAGAGATTCTGTAGCGGCTACGGC	600
FTN_0462 glk	AAGTTTATGCGTAAGACTTTCCATCGTATCTCTCCTGAGAGATTCTGTAGCGGCTACGGC	600
peg.721 glk	AAATTTATGCGTAAGACTTTACACAGAGTTTCTCCGAAAGGTTTTGTAGTGGTTATGGT	600
SD28_07565	AAATTTATGCGTAAGACTCTGCATCGAGTGTCCTCCAGAAAGGTTTTGTAGTGGTTATGGT	600
FTL_0404 glk1	ATTTACAATATTTATAAGTATGTGGTGCGTCATCCTTTATATGATCAACCTGAATGTATG	660
FTT_1295c glk1	ATTTACAATATTTATAAGTATGTGGTGCGTCATCCTTTATATGATCAACCTGAATGTATG	660
FTN_0462 glk	ATTTACAATATTTATAAGTATGTGGTGCGTCATCCTTTATATGATCAACCTGAATGTATG	660
peg.721 glk	ATTTATAATATTTATAAATATGTAGTTAGAAACCCATTATATAATCAACCAGAATGTACC	660
SD28_07565	ATTTATAACATTTACAAATATGTAGTTAGAAACCCTTGTACAATCAGCCAGAATGTACT	660
FTL_0404 glk1	GAGTTACGTAGAGCGTTATTTAGTGTTCAGACTCTGATAAGGCAGCAGTAATTTGTTAAG	720
FTT_1295c glk1	GAGTTACGTAGAGCATTATTTAGTGTTCAGACTCTGATAAGGCAGCAGTAATTTGTTAAG	720
FTN_0462 glk	GAGTTACGTAGAGCGTTATTTAGTGTTCAGACTCTGATAAGGCAGCAGTAATTTGTTAAG	720
peg.721 glk	AGTTTACGTAGAGACCTATTTAAAGTTTCAGATTAGATAAAGCAGCAATAATAGTTAAG	720
SD28_07565	AGTTTACGTAGGAATTTGTTTAGTGTTCAGACTCAGATAAAGCAGCAGCAATAGTTAAG	720
FTL_0404 glk1	TATGCTATTGAGCATAGAGAACCATCAGCATTAAAGGACGATAGATATATTTCTTAAGTATA	780
FTT_1295c glk1	TATGCTATTGAGCATAGAGAGCCATCAGCATTAAAGGACGATAGATATATTTCTTAAGTATA	780
FTN_0462 glk	TATGCTATTGAGCATAGAGAGCCATCAGCATTAAAGGACGATAGATATATTTCTTAAGTATA	780
peg.721 glk	TATGCTATAGAACATAAAGAACCATCTGCTTCAAGAGCTGTAGATATATTTTTGAGTATT	780
SD28_07565	TATGCTATAGAAATATAAAGAACCGTCCGCTTTAAGGACTATAGATATATTTTTGAGCATT	780
FTL_0404 glk1	TATGGCTCAGTTGCTGGTAATTTAGCACTTACAAGTTTACCTTTTAGAGGTCTTTATATT	840
FTT_1295c glk1	TATGGCTCAGTTGCTGGTAATTTAGCACTTACAAGTTTACCTTTTAGAGGTCTTTATATT	840
FTN_0462 glk	TATGGCTCAGTTGCTGGTAATTTAGCACTTACAAGTTTACCTTTTAGAGGTCTTTATATT	840
peg.721 glk	TATGGATCAATTGCAGGTAATCTAGCTTTAACAAGCTTACCATTTAGGGGTTTATATATT	840
SD28_07565	TATGGTTCAATTGCTGGTAATTTAGGCTTTAACAAGCTTGCCATTTAGAGGGTTATATATT	840
FTL_0404 glk1	GCTGGAGGTATTGCACCTAGGCTCATCAAGCAAATAAAGGAGAGTAAATTCTTAGAGAAG	900
FTT_1295c glk1	GCTGGAGGTATTGCACCTAGGCTCATCAAGCAAATAAAGGAGAGTAAATTCTTAGAGAAG	900
FTN_0462 glk	GCTGGAGGTATTGCACCTAGGCTCATCAAGCAAATAAAGGAGAGTAAATTCTTAGAGAAG	900
peg.721 glk	GCCGAGGTATTGCACCAAGACTTATTGATCAGATTAAAGAAAGCAAATTTTGGAAAAA	900

SD28_07565	GCTGGGGGTATTGCTCCACGTCTTATTGATCAGATTAAAGAAAGTAAGTTTTTGGAGAAA	900
FTL_0404 glk1	TTTAGAGATAAAGGTAGAATGTCAAACATGATGAAAGATTTTCCAGTGCATATAATTATG	960
FTT_1295c glk1	TTTAGAGATAAAGGTAGAATGTCAAACATGATGAAAGATTTTCCAGTGCATATAATTATG	960
FTN_0462 glk	TTTAGAGATAAAGGTAGAATGTCAAACATGATGAAAGATTTTCCAGTGCATATAATTATG	960
peg.721 glk	TTTAGAGATAAAGGGAGAATGTCAGCAATGATGAAAGATTTTCCAATCCACATAATAATG	960
SD28_07565	TTTAGAGACAAAGGAAGAATGTCAGCTATGATGAAAGATTTTCCAATTCATATAATTATG	960
FTL_0404 glk1	AACACAGATGTCGGTTTAATAGGCGCGCGTACGTATGCTGCTGGGCTAGTAAAGTAA---	1020
FTT_1295c glk1	AACACAGATGTCGGTTTAATAGGCGCGCGTACGTATGCTGCTGGGCTAGTAAAGTAA---	1020
FTN_0462 glk	AACACAGATGTCGGTTTAATAGGCGCGCGTACGTATGCTGCTGGGCTAGTAAAGTAA---	1020
peg.721 glk	AATACAGACGTTGGATTGATAGGAGCTAGAGCTTATGCTGCAAACCTTGGTTAAAAAAGAT	1020
SD28_07565	AATACAGATGTTGGTTTAATAGGAGCTAGAACTTACGCTGCTAATTTGATTAAAAAAGAT	1020
FTL_0404 glk1	---	1017
FTT_1295c glk1	---	1017
FTN_0462 glk	---	1017
peg.721 glk	TAA	1023
SD28_07565	TAA	1023

Sequenzvergleich verschiedener Glk Proteine (*Fth* LVS FTL_0404; *Fno* U112 FTN_0462; *Ftt* FTT_1295c; F-W12 Peg.721; *A. guangzhouensis* SD28_0756). Erstellt mit Geneious Prime.

FTL_0404 Glk1	MYILSGDIGGTNTRLEVSLLENGATQSI AIRKYKGANFNCLSDIIDKFLSEVDLVGQIDS	60
FTN_0462 Glk	MYILSGDIGGTNTRLEVSLLENGATQSI AIRKYKGANFNCLSDIIDKFLSEVDLVGQIDS	60
FTT_1295c Glk1	MYILSGDIGGTNTRLEVSLLENGATQSI AIRKYKGANFNCLSDIIDKFLSEVDLVGQIDS	60
peg.721 Glk	MYILSGDIGGTNTRLEVSQL ESGTKQSI AVRKYKGADFNCLSDVIDIFLSAIDLAKIDS	60
SD28_07565	MYILSGDIGGTNTRLEVSQL ENGKTQSI AIRKYKGADFNCLSDVIDIFLAEINLAGQIDS	60
FTL_0404 Glk1	VCLAVAGFVSNGEVEVTNLPWMVSEQYISEGLGIDKTKVKVINDFEAIGYGIESLDREKD	120
FTN_0462 Glk	VCLAVAGFVSNGEVEVTNLPWMVSEQYISEGLGIDKTKVKVINDFEAIGYGIESLDREKD	120
FTT_1295c Glk1	VCLAVAGFVSNGEVEVTNLPWMVSEQYISEGLGIDKTKVKVINDFEAIGYGIESLDREKD	120
peg.721 Glk	VCLAVAGFVVDGEVEITNLPWMVSEQYVAEGLGIDKSKVKVINDFEAIGYGIERLDRQKD	120
SD28_07565	VCLAVAGFVVDGEVEITNLPWMVSEQYVAEGLGIDKNKVKVINDFEAIGYGIEKLDRQKD	120
FTL_0404 Glk1	IITI QEGKKDDNLC AVVGAGTGLGMCLVSYDKDDKPRVYKTEGGHVD FSPVDDEQVELF	180
FTN_0462 Glk	IITI QEGKKDDNLC AVVGAGTGLGMCLVSYDKDDKPRVYKTEGGHVD FSPVDDEQVELF	180
FTT_1295c Glk1	IITI QEGKKDDNLC AVVGAGTGLGMCLVSYDKDDKPRVYKTEGGHVD FSPVDDEQVELF	180
peg.721 Glk	IITV QEGKKDDNSLC AVIGAGTGLGMCLVSYDENHKPRVYKTEGGHVD FPPVDDEQVELF	180
SD28_07565	IITI QEGKKDDNSLC VVIGAGTGLGMCLVSYDENHKPRVYKTEGGHVD FSPVGDEQVELF	180
FTL_0404 Glk1	KFMRKTFHRISPERFCSGYGIYNIYKYVVRHPLYDQPECMELRRALFSVSDSDKAAVIVK	240
FTN_0462 Glk	KFMRKTFHRISPERFCSGYGIYNIYKYVVRHPLYDQPECMELRRALFSVSDSDKAAVIVK	240
FTT_1295c Glk1	KFMRKTFHRISPERFCSGYGIYNIYKYVVRHPLYDQPECMELRRALFSVSDSDKAAVIVK	240
peg.721 Glk	KFMRKTLHRVSPERFCSGYGIYNIYKYVVRNPLYNQPECTSLRRDLFKVSDSDKAAIIVK	240
SD28_07565	KFMRKTLHRVSPERFCSGYGIYNIYKYVVRNPLYNQPECTSLRRNLFSVSDSDKAAAIIVK	240
FTL_0404 Glk1	YAIEHREPSALRTIDIFLSIYGSVAGNLALTSLPFRGLYIAGGIAPRLIKQIKESKFLEK	300
FTN_0462 Glk	YAIEHREPSALRTIDIFLSIYGSVAGNLALTSLPFRGLYIAGGIAPRLIKQIKESKFLEK	300
FTT_1295c Glk1	YAIEHREPSALRTIDIFLSIYGSVAGNLALTSLPFRGLYIAGGIAPRLIKQIKESKFLEK	300
peg.721 Glk	YAIEHKEPSASRAVDIFLSIYGSAGNLALTSLPFRGLYIAGGIAPRLIDQIKESKFLEK	300
SD28_07565	YAIEYKEPSALRTIDIFLSIYGSAGNLALTSLPFRGLYIAGGIAPRLIDQIKESKFLEK	300
FTL_0404 Glk1	FRDKGRMSNMMDFPVHIIMNTDVGLIGARTYAAGLVK--	338
FTN_0462 Glk	FRDKGRMSNMMDFPVHIIMNTDVGLIGARTYAAGLVK--	338
FTT_1295c Glk1	FRDKGRMSNMMDFPVHIIMNTDVGLIGARTYAAGLVK--	338
peg.721 Glk	FRDKGRMSAMMKDFPIHIIMNTDVGLIGARAYAAANLVKKD	340
SD28_07565	FRDKGRMSAMMKDFPIHIIMNTDVGLIGARTYAANLIKKD	340

DNA-Sequenzvergleich der PCR-amplifizierten Region des Cytochrom b Gens (mit UNFOR403 und UNREV1205) von *A. sylvaticus*, *A. sylvaticus* Haplotyp Deutschland 1 bzw. 2, *A. flavicollis*, *A. agrarius*, *Mus Musculus* und A-856/2/3 abzüglich der Primersequenz. Erstellt mit Geneious Prime.

A-856/2/3	AGCTACAGTAATTACAAATCTACTATCAGCAATTCCATACATCGGAACTACCCTAGTAGA	60
<i>A. sylvaticus</i> G1	AGCTACAGTAATTACAAATCTACTATCAGCAATTCCATACATCGGAACTACCCTAGTAGA	60
<i>A. sylvaticus</i> G2	AGCTACAGTAATTACAAATCTACTATCAGCAATTCCATACATCGGAACTACCCTAGTAGA	60
<i>A. sylvaticus</i>	AGCTACAGTAATTACAAATCTACTATCAGCAATTCCATACATCGGAACTACCCTAGTAGA	60
<i>A. flavicollis</i>	GGCAACAGTAATTACAAATCTATTATCAGCAATTCCATACATCGGAACTACCCTAGTAGA	60
<i>A. agrarius</i>	GGCAACAGTAATTACAAATCTCCTCTCAGCCATCCCATATATCGGCACTACCCTGGTAGA	60
<i>Mus musculus</i>	CGCCACAGTTATTACAAACCTCCTATCAGCCATCCCATATATTGGAACAACCTAGTCTGA	60
A-856/2/3	ATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGACAAAGCTACATTGACACGTTTTTTTCGCCTTTCA	120
<i>A. sylvaticus</i> G1	ATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGACAAAGCTACATTGACACGTTTTTTTCGCCTTTCA	120
<i>A. sylvaticus</i> G2	ATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGACAAAGCTACATTGACACGTTTTTTTCGCCTTTCA	120
<i>A. sylvaticus</i>	ATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGACAAAGCTACATTGACACGTTTTTTTCGCCTTTCA	120
<i>A. flavicollis</i>	GTGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTAGATAAAGCTACACTAACACGTTCTTTCGCCTTCCA	120
<i>A. agrarius</i>	ATGAATTTGAGGAGGATTCTCAGTAGATAAAGCCACTTTAACACGTTCTTTCGCATTCCA	120
<i>Mus musculus</i>	ATGAATTTGGGGAGGCTTCTCAGTAGACAAAGCCACCTTGACCCGATTCTTTCGCCTTTCCA	120
A-856/2/3	CTTTATCCTTCCATTTATTATTGCTGCCCTAGTAATTGTTTCACCTCTTGTTTCTCCATGA	180
<i>A. sylvaticus</i> G1	CTTTATCCTTCCATTTATTATTGCTGCCCTAGTAATTGTTTCACCTCTTGTTTCTCCATGA	180
<i>A. sylvaticus</i> G2	CTTTATCCTTCCATTTATTATTGCTGCCCTAGTAATTGTTTCACCTCTTGTTTCTCCATGA	180
<i>A. sylvaticus</i>	CTTTATCCTTCCATTTATTATTGCTGCCCTAGTAATTGTTTCACCTCTTGTTTCTCCATGA	180
<i>A. flavicollis</i>	CTTTATCTTACCATTTCATCATTTGCCGCCCTAGTAATCGTCCATCTCCTATTTCTCCATGA	180
<i>A. agrarius</i>	TTTTATTCTCCCATTCATTATCGCAGCCCTGGTAATCGTCCATCTCCTATTTCTCCACGA	180
<i>Mus musculus</i>	CTTCATCTTACCATTTCATCATCGCGGCCCTAGCAATCGTTACCTTCTTTTCCTTCACGA	180
A-856/2/3	AACCTGGATCTAATAACCCAACAGGCCCTAACTCAGACGCCGATAAAATCCCATTTACCCC	240
<i>A. sylvaticus</i> G1	AACCTGGATCTAATAACCCAACAGGCCCTAACTCAGACGCCGATAAAATCCCATTTACCCC	240
<i>A. sylvaticus</i> G2	AACCTGGATCTAATAACCCAACAGGCCCTAACTCAGACGCCGATAAAATCCCATTTACCCC	240
<i>A. sylvaticus</i>	AACCTGGATCTAATAACCCAACAGGCCCTAACTCAGACGCCGATAAAATCCCATTTACCCC	240
<i>A. flavicollis</i>	AACCTGGATCAATAACCCCTACAGGCCCTAACTCAGACGCCGACAAAATCCATTTCCCCC	240
<i>A. agrarius</i>	AACAGGCTCAAACAACCCAACAGGTTTAAACTCAGACGCCGATAAAATCCCATTTACCCC	240
<i>Mus musculus</i>	AACAGGATCAAACAACCCAACAGGATTAATACTCAGATGCAGATAAAATCCCATTTTCATCC	240
A-856/2/3	TTACTATACTATCAAAGATATTCTAGGTGTACTAATARTAGTTTCCTTCCTAATAACTTT	300
<i>A. sylvaticus</i> G1	TTACTATACTATCAAAGATATTCTAGGTGTACTAATAATAGTTTCCTTCCTAATAACTTT	300
<i>A. sylvaticus</i> G2	TTACTATACTATCAAAGATATTCTAGGTGTACTAATAATAGTTTCCTTCCTAATAACTTT	300
<i>A. sylvaticus</i>	TTACTATACTATCAAAGATATTCTAGGAGTACTAATAATAGTTTCCTTCCTAATAACTTT	300
<i>A. flavicollis</i>	GTACTATACTAATAAGACATTCTAGGGGTACTCAATAAGTGTCAATATATACCTT	300
<i>A. agrarius</i>	ATACTACACAATTAAGATATTCTAGGCATTTTCATTATAATTATATTCCTAATAACCCCT	300
<i>Mus musculus</i>	CTACTATACTAATAAGATATCTAGGTATCTAATTATATTCTTAATTCTCATAACCCCT	300
A-856/2/3	AGTCCTTTTCTTTCCAGACCTACTAGGTGACCCGGACAACCTATATACCTGCCAACCCACT	360
<i>A. sylvaticus</i> G1	AGTCCTTTTCTTTCCAGACCTACTAGGTGACCCGGACAACCTATATACCTGCCAACCCACT	360
<i>A. sylvaticus</i> G2	AGTCCTTTTCTTTCCAGACCTACTAGGCGACCCGGACAACCTATATACCTGCCAACCCACT	360
<i>A. sylvaticus</i>	AGTCCTTTTCTTTCCAGACCTACTAGGCGACCCGGACAACCTATATACCTGCCAACCCACT	360
<i>A. flavicollis</i>	AGTTCTCTTCTTTCCAGACCTTCTAGGTGACCCGGATAACTATATACCTGCCAACCCACT	360
<i>A. agrarius</i>	GGTCCTATTCTTCCCGGACCTACTTGGAGACCCAGATAATTACACACCAGCAAACCCACT	360
<i>Mus musculus</i>	AGTATTATTCTTCCCGGACATACTAGGAGACCCAGACAACCTACATACCAGCTAACCCACT	360
A-856/2/3	TAACACCCACCCCATATTAAACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCAATCCTACG	420
<i>A. sylvaticus</i> G1	TAACACCCACCCCATATTAAACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCAATCCTACG	420
<i>A. sylvaticus</i> G2	TAACACCCACCCCATATTAAACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCAATCCTACG	420
<i>A. sylvaticus</i>	TAACACCCACCCCATATTAAACCAGAATGATACTTCCTATTTGCCTATGCAATCCTACG	420
<i>A. flavicollis</i>	AAATACCCACCCACATTAACCAGAATGGTACTTCCTATTTGCATACGCAATTCTACG	420
<i>A. agrarius</i>	TAATACACCACCATATCAAACCAGAATGATACTTCTATTTGCCTATGCAATCCTACG	420
<i>Mus musculus</i>	AAACACCCACCCCATATTAAACCCGAATGATATTTCCTATTTGCATACGCTATTCTACG	420
A-856/2/3	ATCCATCCCCAATAAACTAGGCGGAGTCCTAGCCCTAATTCTATCAATCTTAATTTTAGC	480
<i>A. sylvaticus</i> G1	ATCCATCCCCAATAAACTAGGCGGAGTCCTAGCCCTAATTCTATCAATCTTAATTTTAGC	480
<i>A. sylvaticus</i> G2	ATCCATCCCCAATAAACTAGGCGGAGTCCTAGCCCTAATTCTATCAATCTTAATTTTAGC	480
<i>A. sylvaticus</i>	ATCCATCCCCAATAAACTAGGCGGAGTCCTAGCCCTAATTCTATCAATCTTAGTTTTAGC	480
<i>A. flavicollis</i>	ATCCATCCCTAACAAATTAGGTGGAGTCCTAGCCCTAATTTTATCTATCCTTATTCTAGC	480
<i>A. agrarius</i>	CTCTATTCCAAACAACTAGGAGGAGTCCTAGCCCTAGTCCTATCCATCCTTATCCTAGC	480
<i>Mus musculus</i>	CTCAATCCCCAATAAACTAGGAGGTGTTCTAGCCTTAATCTTATCTATCCTAATTTTAGC	480
A-856/2/3	CCTATTACCATTCTCCACACTTCCAACAACGCAGTCTAATATTCGCCCCAATCACTCA	540
<i>A. sylvaticus</i> G1	CCTATTACCATTCTCCACACTTCCAACAACGCAGTCTAATATTCGCCCCAATCACTCA	540

A.sylvaticus G2	CCTATTACCATTCTCCACACTTCCAAACAACGCAGTCTAATATTCGCCCCAATCACTCA	540
A.sylvaticus	CCTATTACCATTCTCCACACTTCCAAACAACGCAGTCTAATATTCGCCCCAATCACTCA	540
A.flavicollis	CCTATTACCATTCTCCACACTTCCAAACAACGCAGCCTAATATTCGTCCTAATCACTCA	540
A.agrarius	CTTACTGCCACTTCTTCACACTTCCAAACAACGAAGCCTAATATTCGTCCTAATCACTCA	540
Mus musculus	CCTAATACCTTTCTTCATACCTCAAAGCAACGAAGCCTAATATTCGCCCCAATCACTCA	540
A-856/2/3	AACCCTATATTGAATCCTAGTTGCCAACCTTCTCATTC	578
A.sylvaticus G1	AACCCTATATTGAATCCTAGTTGCCAACCTTCTCATTC	578
A.sylvaticus G2	AACCCTATATTGAATCCTAGTTGCCAACCTTCTCATTC	578
A.sylvaticus	AACCCTATATTGAATCCTAGTTGCCAACCTTCTCATTC	578
A.flavicollis	AACCCTATACTGAATCCTAGT-GCTAACCTTCTCGTCC	577
A.agrarius	AATACTCTACTGAATCCTAGTAGCTAACCTTCTCGTCC	578
Mus musculus	AATTTTGTACTGGATTCTAGTAGCTAATCTACTTATCC	579

Tab. 27: OD₆₀₀ Werte nach einer Inkubation von 24 h in Medium T.

Stamm	Wachstum nach 24 h in MT (OD ₆₀₀)
F-W12	1,87 ± 0,08
F-W12 FIV2-Val	1,81 ± 0,05
F-W12 $\Delta impB-orfE$	1,84 ± 0,11
F-W12 $\Delta impB2C2$	1,82 ± 0,09
F-W12 $\Delta impB-orfE\Delta impB2C2$	1,81 ± 0,04
F-W12 $\Delta impB-orfE + FIV2-impB-orfE$	1,84 ± 0,06
F-W12 $\Delta impB-orfE\Delta impB2C2 + FIV-impB-orfE$	1,78 ± 0,04
F-W12 $\Delta orfD1$	1,83 ± 0,06
F-W12 $\Delta orfD1 + FIV-orfD1$	1,81 ± 0,07
F-W12 ΔMyo	1,83 ± 0,08
F-W12 ΔMyo FIV2-Val	1,82 ± 0,02
F-W12 ΔMyo FIV2-Myo	1,81 ± 0,07
Sc#50 FIV2-Val	0,942 ± 0,11
Sc#50 FIV2- <i>glk</i>	1,81 ± 0,05
<i>Fth</i> LVS	1,97 ± 0,07
<i>Fth</i> LVS $\Delta iglC$	2,08 ± 0,01
<i>Fth</i> LVS $\Delta vgrG$	2,13 ± 0,02
<i>Fth</i> LVS $\Delta iglC + FIV2-impB-orfE$	2,08 ± 0,10
<i>Fth</i> LVS $\Delta vgrG + FIV2-orfD1$	2,03 ± 0,11
<i>Fth</i> LVS $\Delta vgrG + FIV-orfD1$ Myc	2,05 ± 0,01
<i>Fth</i> LVS $\Delta iglC + FIV2-iglC$ <i>Fth</i>	2,05 ± 0,01
<i>Fth</i> LVS $\Delta iglC + FIV2-iglC$ Myc	2,16 ± 0,00
<i>Fno</i> U112	2,15 ± 0,21
<i>Fno</i> U112 $\Delta iglC$	2,30 ± 0,02
<i>Fno</i> U112 $\Delta iglC + FIV2-impB-orfE$	2,32 ± 0,05
<i>Fno</i> Fx1	2,37 ± 0,03

Tab. 28: Übersicht der 79 Scatterklone (Sc).

Sc #	A.I.	Temp	Überlebensrate [^]	Insertionsort peg. ¹	Protein	Homolog in Fno	Proteinidentität (%)	Ref.*
1	118	RT	0,51 ± 0,42					
2	118	RT	0,07 ± 0,07	631	DegT	FTN_1430	90,03	
3	118	RT	0,48 ± 0,06					
4	118	RT	0,49 ± 0,06	1424	Hydratase	FTN_1438	77,72	[213]
5	118	RT	1,01 ± 0,49					
6	118	RT	0,53 ± 0,43	828	Hydrolase	FTN_0297	70,75	[179, 211, 213]
7	118	RT	0,01 ± 0,02	1522	FtsH	FTN_0668	88,68	
8	118	RT	0,33 ± 0,14					
9	118	RT	0,44 ± 0,02					
10	118	RT	0,56 ± 0,13					
11	118	RT	0,47 ± 0,28					
12	118	RT	0,41 ± 0,09					
13	118	RT	0,43 ± 0,18					
14	118	RT	0,08 ± 0,08	413	GalU	FTN_0729	87,46	
15	118	RT	0,29 ± 0,30					
16	118	RT	0,05 ± 0,04	413	GalU	FTN_0729	87,46	
17 ⁰	118	RT	0,06 ± 0,1	1387	MlaA	FTN_0322	65,52	[213]
18	118	RT	1,06 ± 1,15					
19	118	RT	0 ± 0	1447	GtrB	FTN_1403	82,26	
20 ⁰	118	RT	0 ± 0	1387	MlaA	FTN_0322	65,52	[213]
21	118	RT	0,12 ± 0,14	1224	MlaD	FTN_0326	77,27	[211, 213]
22	118	RT	1,28 ± 0,91	1091	PpdK	FTN_0064	91,78	
23	118	RT	0,49 ± 0,68					
24	118	RT	0,95 ± 0,94	1091	PpdK	FTN_0064	91,78	
25	118	RT	0,41 ± 0,51					
26	118	RT	0,37 ± 0,39	1216	HP	FTN_0324	50,57	
27 ⁰	118	RT	0,89 ± 0,71	1215	YrbC	FTN_0325	76,92	[213]
28	118	RT	0,39 ± 0,24	1387	MlaA	FTN_0322	65,52	[213]
29	118	RT	0,6 ± 0,43					
30	118	RT	0,32 ± 0,23	1096	HtrB	FTN_0071	80,78	[213]
31	118	RT	0,69 ± 0,53					
32	118	RT	0,19 ± 0,32	1387	MlaA	FTN_0322	65,52	[213]
33	118	RT	3,77 ± 2,71	228	PutA	FTN_1131	84,06	[179, 213]
34	118	RT	1,24 ± 1,66					
35	118	RT	1,47 ± 1,33					
36	118	RT	1,89 ± 1,58	705	HigB	FTN_1580	25,64	[212]
37	118	RT	0 ± 0	266	LptE	FTL_1211	55,9	
38	45	25°C	0,26 ± 0,05					

Sc #	A.I.	Temp	Überleben srate^	Insertions ort peg. ¹	Protein	Homolog in Fno	Protein-identität (%)	Ref.*
39	45	25°C	0,05 ± 0,06	249	TalA	FTN_0781	73,21	[212]
40	45	25°C	0,23 ± 0,1	325	TypA	FTN_1157	33,33	[211]
41	45	25°C	0,88 ± 0,86					
42	45	25°C	0,39 ± 0,06					
43	45	25°C	0,61 ± 0,36					
44	45	25°C	1,61 ± 1,93					
45	45	25°C	0,55 ± 0,36					
46	45	25°C	0,11 ± 0,16	266	LptE	FTL_1211	55,9	
47	45	25°C	0,36 ± 0,30					
48	45	25°C	0,27 ± 0,04					
49	118	RT	0,09 ± 0,06	1272	RelA	FTN_1518	81,49	[179, 212, 213]
50	118	RT	1,62 ± 0,56	721	Glk	FTN_0462	86,39	
51	45	25°C	0,21 ± 0,1	816	Chitinase	FTN_1744	43,75	
52	45	25°C	0,17 ± 0,03	102	Aminase	FTN_1444	85,8	
53	45	25°C	0,38 ± 0,19					
54	45	25°C	0,56 ± 0,63	766	HP	n.p.		
55	45	25°C	1,45 ± 0,91	993	CyoB	FTN_0196	88,26	[179]
56	118	RT	1,38 ± 0,27	216	Hydroxy-lase	FTN_0797	51,41	
57	118	RT	0,59 ± 0,47					
58	118	RT	0,27 ± 0,21					
59	118	RT	0,97 ± 0,74					
60	118	RT	1,65 ± 1,06	1455	ArsR	FTN_1393	73,74	
61	118	RT	0,56 ± 0,40					
62	118	RT	0,19 ± 0,18	792	GlpD	FTN_1584	85,46	[212, 213]
63	118	RT	0,76 ± 0,65					
64	118	RT	1,23 ± 1,49					
65	45	25°C	0,14 ± 0,1	1387	MlaA	FTN_0322	65,52	[213]
66 ⁰	45	25°C	1,2 ± 1,28	1469		FTN_1372	47,56	[212, 213]
67	45	25°C	1,13 ± 1,55					
68	45	25°C	0,89 ± 0,97					
69	45	25°C	1,05 ± 0,30					
70	45	25°C	0,46 ± 0,18					
71	45	25°C	0,34 ± 0,29					
72	45	25°C	0,58 ± 0,51					
73	45	25°C	0,69 ± 0,88					
74	45	RT	0,75 ± 0,11					
75	45	RT	0,28 ± 0,15					
76	45	25°C	0,43 ± 0,60					
77	45	25°C	0,21 ± 0,29					

Sc #	A.l.	Temp	Überleben rate [^]	Insertions ort peg. ⁱ	Protein	Homolog in Fno	Protein- identität (%)	Ref.*
78	45	25°C	0,22 ± 0,25					
79	45	25°C	0,51 ± 0,48					

[^] Überlebensrate in *A. lenticulata* 118: Quotient aus CFU/ml von Tag 7 und Tag 0 der Scatterklone im Verhältnis zum Quotienten des Wildtyps

ⁱ Tn5-Insertionsort in „protein encoding gene“ [165]

* *Fno* Homolog bereits in anderen Testverfahren identifiziert

^o multiple Produkte in der inverse PCR

A.l.: *A. lenticulata*; Temp.: Temperatur; *Fno*: *F. novicida*; HP: hypothetisches Protein

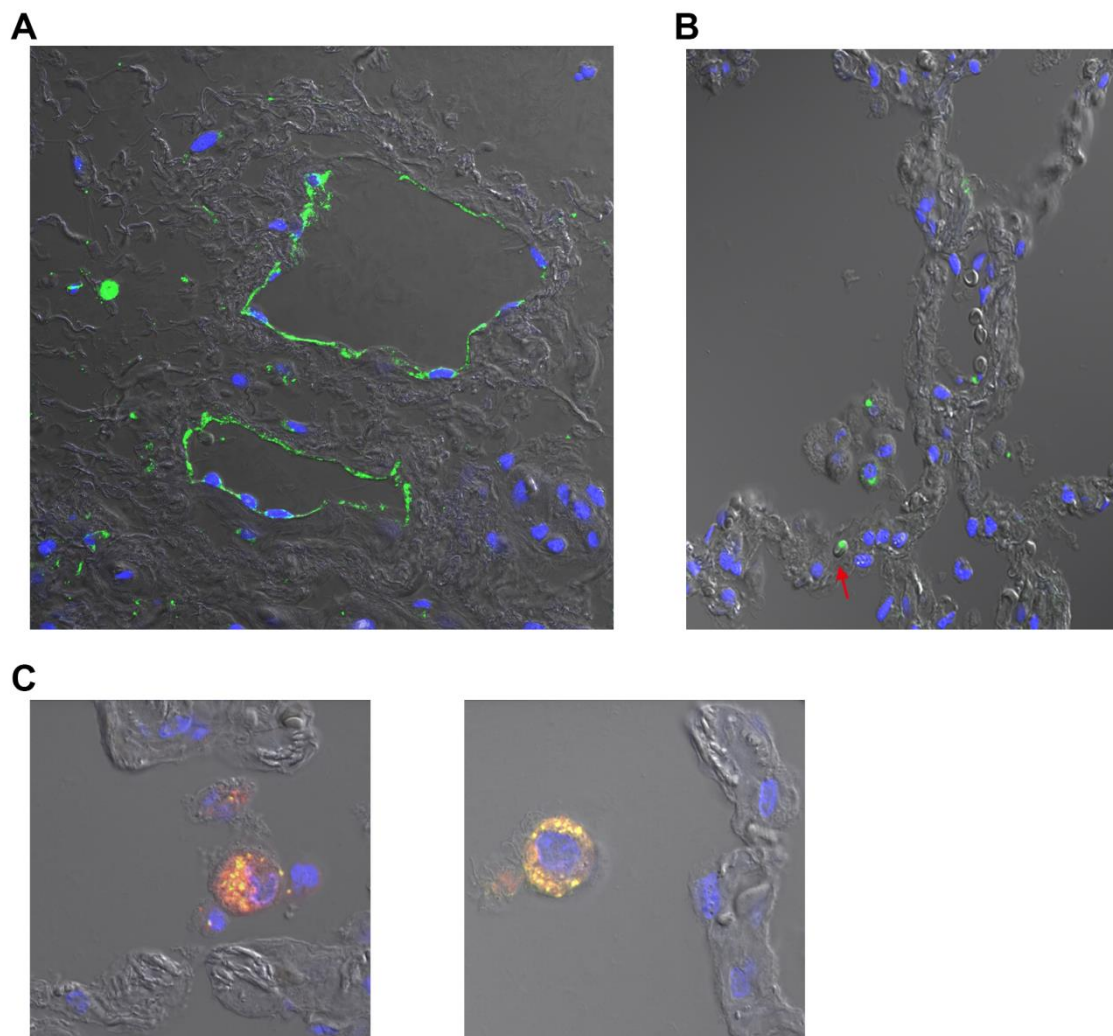


Abb. 41: Vorläufige Ergebnisse der Replikation von *Fth* A660 im humanen Lungengewebe. Das Lungengewebe wurde mit 10^7 CFU/ml von *Fth* A660 für 2 h infiziert und anschließend mit 50 µg/ml Gentamicin für 1 h behandelt. Nach 48 h der Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit anti-*Fth*-LPS (grün, mAb clon 140/11/1/6), DAPI (blau) und anti-CD68 (rot, Alveolarmakrophagenmarker, nur in C) angefärbt. Der rote Pfeil in B markiert einen evtl. infizierten Erythrozyten.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Defenition
%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ACES	N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
ad	auffüllen auf
d.h.	das heißt
Amp	Ampicillin
ggfs.	gegebenenfalls
ATP	Adenosin-5´-Triphosphat
BCYE	„Buffered Charcoal Yeast Extract“
BLAST	„Basic local alignment search tool“
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
can	canonical, kanonisch
CFU	Colony forming units, Kolonie bildende Einheiten
CHAB	„cystein-heart-blood-agar“
CHAB-PACCV	CHAB mit Polymyxin B, Amphotericin B, Cyclohexamid, Cefepim Vancomycin
Cm	Chloramphenicol
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
et al.	et altera, und Andere
evtl.	eventuell
F	Farad
FIV-Val	<i>Francisella</i> Integrationsvektor-tRNA ^{Val} -spezifisch
Fno	<i>Francisella novicida</i>
FPI	<i>Francisella</i> Pathogenitätsinsel
<i>Fth</i>	<i>Francisella tularensis holarctica</i>
<i>Ftt</i>	<i>Francisella tularensis tularensis</i>
F-W12	<i>Francisella</i> sp. W12-1067 Isolat
g	Gramm
<i>g</i>	mittlere Erdschwerebeschleunigung
ggfs.	gegebenenfalls
h	hour(s), Stunde(n)
HRP	„horse reddish peroxidase“, Meerrettichperoxidase

Abkürzung	Defenition
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
IPTG	Ispropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Heamocyanin
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Bertani
LVS	„Live Vaccine Strain“
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	„multiplicity of infection“
MT	Medium T
MTKH	Medium T Agar mit Aktivkohle und Hämoglobin
NGS	„Next generation sequencing“, Sequenzierung der nächsten Generation
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	“open reading frame“, Offener Leserahmen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	„Polymerase-chain-reaction“
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acatat
PYG	Peptone Yeast Glucose
R	Resistenz
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transcription
RKI	Robert Koch-Institut
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SNP	„Single Nucleotide Polymorphism“, Einzelnukleotid-Polymorphismus
sp.	Spezies
ssp.	Subspezies
T6SS	Typ-VI-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tn	Transposon

Abkürzung	Defenition
Tris	Trishydroxylmeththylaminomethan
ÜN-Kultur	Übernachtkultur
V	Volt
Val	Valin
vs.	gegen
vgl.	vergleiche
WGS	„Whole genome sequencing“, Vollständige Genom-Sequenzierung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
YEB	Buffered Yeast Extract
z.B.	zum Beispiel
ZBS	Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene
α	anti
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ω	Ohm

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Pathogenetische und Molekularepidemiologische Studien zu *Francisella* in Deutschland“ selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die vorliegende Arbeit ist frei von Plagiaten. Alle Ausführungen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Ich versichere außerdem, dass ich die vorliegende Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Datum

Unterschrift